

# ACTA

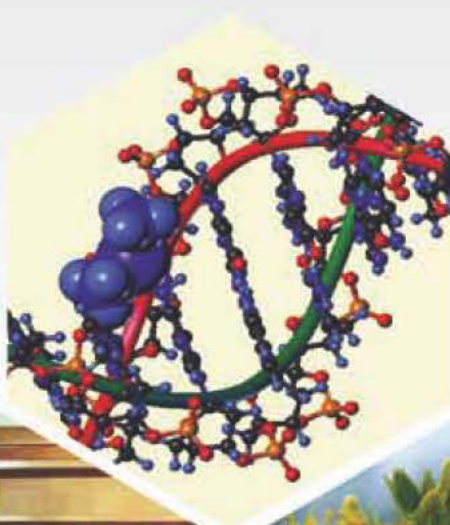
## PHARMACEUTICA HUNGARICA

# 2.

## 2017

APHGAO 87, (043) 37–84. (2017)

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata





# ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hógyes E. u. 9.  
Tel.: 217-0891;  
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,  
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,  
1092 Budapest, Hógyes E. u. 7–9.  
Tel.: 217-0927;  
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, †Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica  
1092 Budapest, Hógyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,  
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.  
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

---

## TARTALOM

<i>Krekó Marcell, Őrfi László: Kovalens kinázgátlók a célzott daganatterápiában . . . . .</i>	39
<i>Benke Edit, Szabóné Révész Piroska, Ambrus Rita: Innovatív technológiájú ciprofloxacín-hidroklorid tartalmú száraz porinhalációs rendszer fejlesztése . . . . .</i>	49
<i>Benke Edit, Szabóné Révész Piroska, Hopp Béla, Ambrus Rita: Hordozó alapú száraz porinhalációs rendszerek jellemzése és fejlesztési lehetőségei . . . . .</i>	59
<i>Tari Tímea, Aigner Zoltán: Folyamatos kristályosítási eljárás fejlesztése impinging jet módszerrel .</i>	69
<i>Végh Krisztina, Riethmüller Eszter, Alberti Ágnes, Tóth Anita, Béni Szabolcs, Kéry Ágnes: A <i>Tanacetum parthenium</i> L. partenolid tartalmának szuperkritikus fluid extrakciója: kísérlettervezés, modellezés, optimalizálás . . . . .</i>	77

## CONTENTS

<i>Krekó, M., Őrfi L.</i> : Covalent Kinase Inhibitors in Targeted Tumour Therapy .....	39
<i>E. Benke, P. Szabó-Révész, R. Ambrus.</i> : Development of ciprofloxacin hydrochloride containing dry powder inhalation system with an innovative technology .....	49
<i>E. Benke, P. Szabó-Révész, R. Ambrus.</i> : Characterization and development of carrier-based dry powder inhaler systems .....	59
<i>Tari, T., Aigner, Z.</i> : Development of continuous crystallization process using impinging jet method .	69
<i>Végh K., Rietmüller E., Alberti Á., Tóth A., Béni Sz. Kéry Á.</i> : Supercritical fluid extraction and convergence chromatographic determination of parthenolide in <i>Tanacetum parthenium</i> L.: experimental design, modeling and optimization .....	77

## Kovalens kinázgátlók a célzott daganatterápiában

KREKÓ MARCELL<sup>1</sup>, ÓRFI LÁSZLÓ<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Budapest, Hőgyes Endre u. 9, 1092

<sup>2</sup> VichemChemie Kutató Kft., Budapest, Herman Ottó u. 15, 1022

\*Levelező szerző: orfi.laszlo@pharma.semmelweis-univ.hu

### Summary

KREKÓ, M., ÓRFI L.: *Covalent Kinase Inhibitors in Targeted Tumour Therapy*

**Introduction:** Kinase inhibitors with antitumour effect have developed rapidly in the 21st century, and are now widely used as chemotherapeutic agents throughout the world. However, a problem is posed by the fact that patients develop acquired resistance to the drugs usually within a year, which results in the inefficacy of the therapy and gradual deterioration of the patient's condition. A new generation of kinase inhibitors, called covalent inhibitors, are meant to provide a solution to acquired resistance.

**Objective and Methods:** We surveyed various scientific papers and publications from pharmaceutical regulatory agencies in this topic. In this paper we describe the development of public covalent EGFR inhibitors, and in more detail, three currently approved covalent drugs. We have demonstrated the binding mode of the molecules with the aid of molecular modelling and docking. In this article, we also provide a short description of covalent docking, with additional results of our research in the field, and ultimately, we reflect on the future role of covalent kinase inhibitors in cancer therapy.

**Results:** Covalent inhibitors exhibit a distinct binding mode to their targets by forming an irreversible covalent bond with a cysteine residue in the active site. Their mode of action enables them to possess higher affinity and favourable selectivity over their reversible counterparts, and thus, with the use of rational drug design principles and modern in silico methods, give us the opportunity to produce successful drug candidates. To analyse the ligand-enzyme complexes of our novel kinase inhibitor compounds, which we assume to have an irreversible mode of action, and to determine the interactions necessary for their binding, we have created a parameter set for the Schrödinger Suites software containing the covalent docking reaction mechanism of our compound type, which we used successfully for this purpose.

**Conclusions:** The emerging problems of covalent inhibitors are yet to be solved, nevertheless, their group forms a part of cancer therapy of increasing importance. The successful covalent docking of our compounds further reinforces our theory, that we managed to produce an irreversible acting kinase inhibitor family with an atypical reactive group.

### Összegzés

**Bevezetés:** A tumorelleses hatású kinázgátló vegyületek gyors fejlődésen mentek keresztül a huszonegyedik század során, és ma már világszerte fontos részét képezik a daganatterápiának. Problémát okoz azonban a betegekben kialakuló szerzett rezisztencia a gyógyszerekre, mely általában egy éven belül a kezelés hatástalanságát és a beteg állapotromlását eredményezi. A kinázgátló vegyületek új generációja, a kovalens gátlószerek hívatottak megoldást szolgáltatni a rezisztencia problémájára.

**Célkitűzés és Módszerek:** Áttekintettük a témában megjelent szakirodalmi publikációk, valamint az egyes gyógyszerfelügyeleti hatóságok hivatalos kiadványait. Cikkünkben ismertetjük a kovalens EGFR-gátlók fejlődését, és részletesebben foglalkozunk három, már engedéllyel rendelkező kovalens kinázgátlóval. A vegyületek kötődési módját molekulamodellezés és dokkolás segítségével mutatjuk be. Rövid leírást szolgáltatunk továbbá a kovalens dokkolás kivitelezéséről, a Schrödinger Suites szoftver anyagaink szerkezetére adaptált, egyedi paraméterezéséről, saját kutatási eredményeinkkel kiegészítve, végül pedig mérlegeljük a kovalens kinázgátlók jövőbeni szerepét a terápiában.

**Eredmények:** A kovalens inhibitorok sajátossága az irreverzibilis kötődés célnziműkhöz egy annak kötőhelyén található cisztein aminosaván keresztül. Hatásmódjuknak köszönhetően magasabb affinitást és kedvezőbb szelektivitást mutathatnak reverzibilis rokonaikkal szemben, így racionális hatóanyagtervezés és korszerű in silico módszerek segítségével sikeres gyógyszerjelölt vegyületek előállítására adnak lehetőséget. Hogy saját, feltételezhetően irreverzibilis kinázgátló vegyületeink ligandum-enzim szerkezetét és kötődéshez szükséges kölcsönhatásait vizsgáljuk, létrehoztunk egy, a kovalens dokkolás reakciómechanizmusát (a Schrödinger Suites szoftverben) leíró paraméter fájlt, melyet sikeresen alkalmaztunk.

**Következtetések:** A kovalens gátlószerek kapcsán felmerülő problémák egyelőre megoldatlanok, azonban mindezek ellenére is egy egyre növekvő fontosságú csoportját képezik a rákellenes terápiának. Vegyületeink sikeres kovalens dokkolása alátámasztja elképzelésünket, miszerint egy nem konvencionális reaktív csoportot tartalmazó, irreverzibilisen kötődő vegyület-családot sikerült kifejlesztenünk.



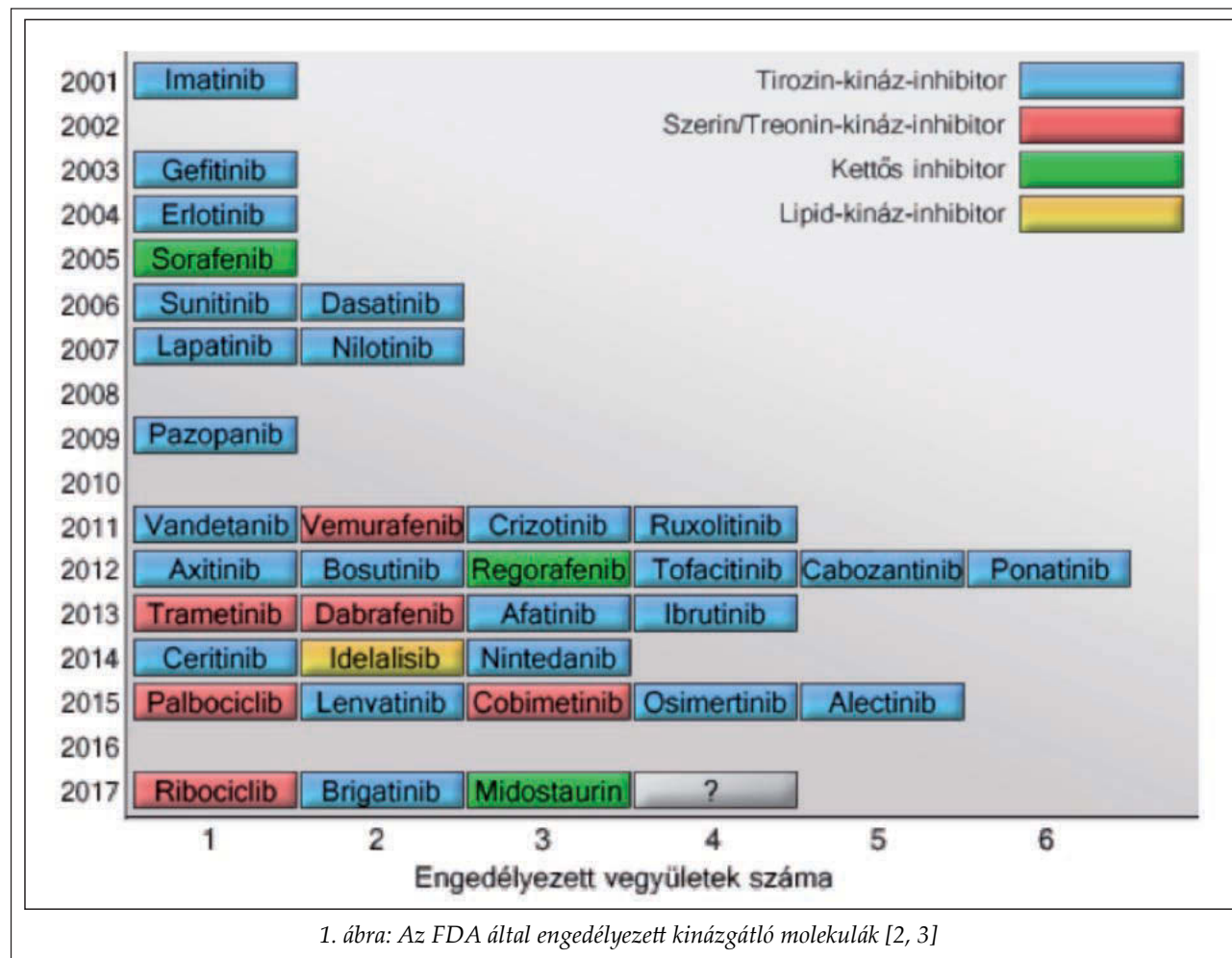
## Bevezetés

Az első kinázgátló vegyületek sikeres alkalmazása a tumorelles terápia területén nagyszámú új, kinázokat célzó molekula előállítását eredményezte az elmúlt évek során [1, 2]. A korábbi citotoxikus szerekkel ellentétben ezek a vegyületek kifejezetten a daganatok kialakulásának hátterében álló, rendellenesen működő enzimeket gátolják, kisebb-nagyobb mértékű szelektivitással. Ennek köszönhetően kevesebb az alkalmazásuk során kialakuló mellékhatások száma, valamint csekélyebb azok súlyossága. Problémát jelent azonban a kezelés során a gyógyszervegyületekre kialakuló rezisztencia, és ennek következtében a terápia hatásosságának csökkenése. A betegek átmeneti állapotjavulását követően, általában egy éven belül, újraindul a betegség progressziója, melyet a fennálló kezeléssel már nem lehet orvosolni [4, 5].

A rezisztencia kialakulását okozhatja a kináz ATP-affinitásának növekedése, ami az enzimatis aktivitás fennmaradását eredményezi a gátló vegyület alkalmazása esetén is. Egy másik kiváltó ok a

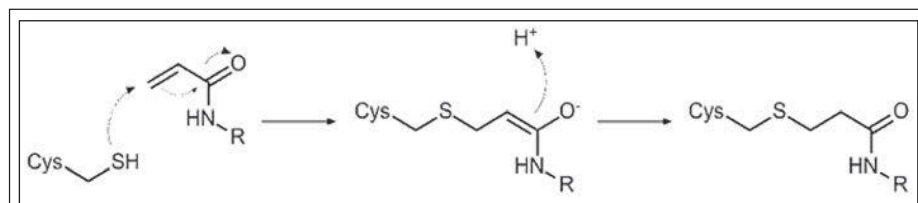
kináz egy olyan mutáns formájának előtérbe helyeződése lehet, melynek kötőhelye a vad típushoz képest megváltozott tulajdonságokkal rendelkezik, így a gyógyszervegyület elveszti affinitását iránta. A legtöbb előállított kinázgátló másodlagos kölcsönhatásokkal kapcsolódik a célnziméhez. Az ATP-kompetitív kötődési mód és a reverzibilis kapcsolódás lehetővé teszi a fent említett rezisztenciamechanizmusok kialakulását, így a vegyülettől függetlenül várható a kezelés hatékonyságának romlása [6, 7].

A kovalens inhibitorok a kinázgátlók speciális csoportját alkotják. Sajátosságuk az irreverzibilis kötődés az enzimhez, annak egy cisztein aminosaván keresztül. ATP-koncentrációtól függetlenül képesek kifejteni gátló hatásukat, és egy kovalens addukt létrejöttének köszönhetően véglegesen inaktívják célpontjukat, melyet a tumorsejtnek ismét elő kell állítania [6]. Köszönhetően az egyes rezisztenciaformákat áthidalni képes hatásmechanizmusuknak, a kovalens vegyületek jelentősége növekvő tendenciát mutat a daganatterápiában: 2013 óta három kovalens vegyület kapott forgalomba hozatali engedélyt az FDA-tól [8], melyek-

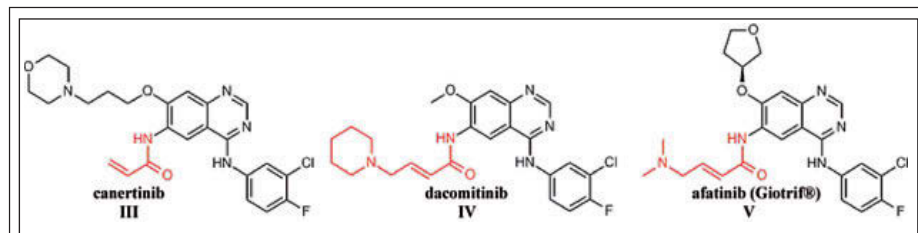


1. ábra: Az FDA által engedélyezett kinázgátló molekulák [2, 3]





5. ábra: Az akrilamid és a cisztein tiolcsoportja között végbemenő Michael-addíció [6]



6. ábra: Második generációs EGFR-gátlók: canertinib, dacomitinib, afatinib

es ciszteinjéhez kovalensen kötődni képes, anilínokina-zolin-vázas (vagy anilínokinaolin-vázas, ld. **VIII**, **IX**) vegyületeket. Jellemzőjük, hogy a leggyakrabban előforduló L858R aktiváló mutációt, valamint az első generációs gátlókra kialakuló rezisztencia hátterében húzódó T790M pontmutációt hordozó EGFR-formákat is képesek gátolni [15]. A csoport első klinikai vizsgálatokig jutó tagja a canertinib (CI-1033) (**III**), mely az EGFR, valamint az ErbB-

lis kötődés révén térközelségbe kerülhet a kötőhely egy cisztein aminosavával, mely deprotonált állapotban nukleofilként viselkedik. A tiolát anion és az elektrofil között lejátszódó reakció egy kovalens kötés kialakulását eredményezi. A 3. ábrán láthatók a szakirodalomban leírt, kovalens gátlók esetében alkalmazható elektrofil csoportok [14].

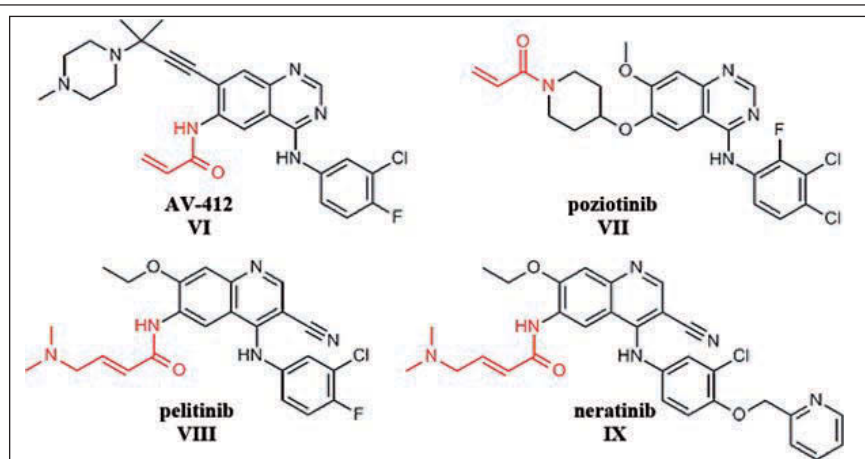
Fontos szempont a „warhead” motívum megválasztásánál, hogy az elektrofil csoport mérsékelt reaktivitással rendelkezzen, és csak akkor lépjen kölcsönhatásba a tiolát anionnal, ha a vegyület alapváza másodlagos kölcsönhatásokon keresztül stabilizálódott a kötőhelyen, és a reaktív atomok egymás közvetlen közelében helyezkednek el. Ily módon nagyrészt elkerülhető az „off-target” reaktivitás, és nagymértékben növelhető a vegyületek szelektivitása, mivel a hatás kialakulásához szükséges koncentrációban a vegyület a célnzimek kötőhelyen lévő ciszteinjéhez nagyságrendekkel jobban kötődik az egyéb tiolcsoportot tartalmazó molekuláknál [6, 15].

A témában zajló kutatások általában akrilamid-csoportot hordozó vegyületek előállítását tűzik ki célul, a legtöbb kovalens gátló, mely klinikai vizsgálati szakaszba került, is ilyen csoporttal rendelkezik. Az akrilamid kettőskötéséhez a cisztein tiolát anionja Michael-addíció során kapcsolódik, ezért gyakran találkozhatunk a Michael-akceptor kifejezéssel, mely a „warhead”-re vonatkozik.

Második generációs EGFR-gátlóknak nevezik a kináz 797-

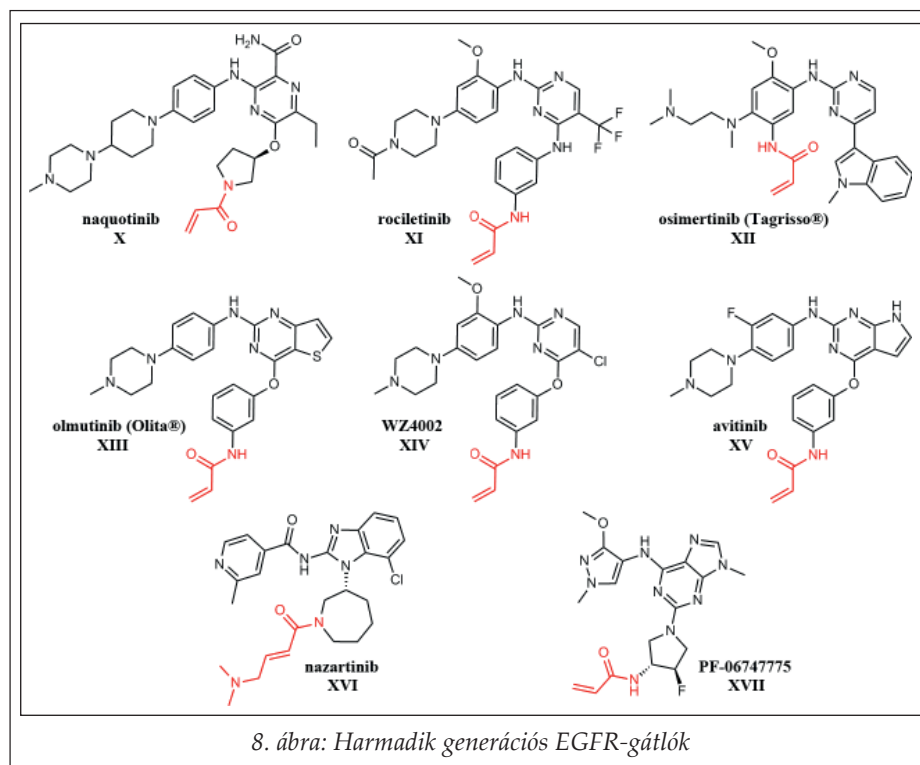
család többi tagjának (HER2-4) aktivitását alacsony nanomoláris koncentrációban gátolja. A vegyület tumorelles hatást mutat a tüdőrák és a mellrák egyes fajtáin, azonban fázis II klinikai vizsgálatok alapján terápiás alkalmazhatósága megkérdőjelezhető, valamint dóziszfüggő, esetenként súlyos toxicitást mutat, így a vegyület fejlesztését leállították [17]. A canertinibet követte többek között a dacomitinib (PF-00299804) (**IV**), melyekkel fázis III vizsgálatokat végeztek, majd az afatinib (BIBW2992) (**V**), amely 2013-ban kapott forgalomba hozatali engedélyt EGFR-mutáció-pozitív, áttétet adó nem kissejtes tüdőrák terápiájára [18].

A dacomitinib és az afatinib elektrofil csoportja szubsztituált akrilamid. A kettőskötéshez kapcsolódó, oldhatóságot növelő alifás lánc mindkettő esetében egy tercier nitrogénatomot hordoz, mely egyes feltevések szerint elősegíti a cisztein tiolcsoportjának deprotonálódását azáltal, hogy egy bázikus centrumot szolgáltat a kénatom közelében



7. ábra: Egyéb második generációs EGFR-gátló anyagok





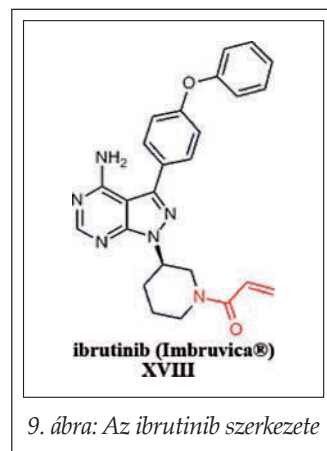
[19]. Az afatiniben található dimetilaminometil-szubsztituens továbbá megnöveli a vegyületek féléletidejét a sejteken belül, mindamellett, hogy a vegyület inhibitor potenciálja megmarad [20].

Az EGFR(T790M) a szerzett rezisztenciák hátterében leggyakrabban álló mutáns forma, melynek kötőhelyén a 790-es metionin oldallánca szterikus gátat jelent a kinazolináz EGFR-gátlók anilinrészére a kötődés során, így a második generációs gátlók aktivitása a vad típuson jóval erősebb, mint

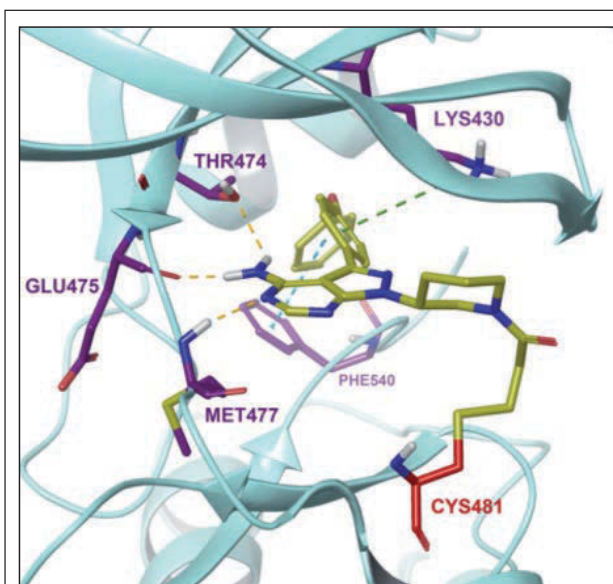
lyek dózislimitáló faktorok az adagolás során.

Az EGFR-gátlók harmadik generációját olyan vegyületek alkotják, melyek nem kinazolináz vegyületek, és a T790M mutáns formára jelentős gátló hatást gyakorolnak, míg a vad típushoz affinitásuk alacsony [15]. A csoport tagjainak hatását a T790M mutációt hordozó betegeken vizsgálják. A naquotinib (ASP8273) (X) és a rociletinib (CO-1686) (XI) fázis III vizsgálatokban vesz részt jelenleg is [9, 22], az osimertinib (AZD9291) (XII) alkalmazását pedig 2015-ben engedélyezte az FDA [23]. Az olmutinib (BI 1482694 / HM 61713) (XIII) Dél-Koreában kapott forgalomba hozatali engedélyt 2016-ban, azonban a koreai állami szabályozó szerv, az MFDS rövidesen figyelmeztetést adott ki a gyógyszerrel kapcsolatban, annak súlyos, esetenként halálos kimenetelű bőrreakciókat (Stevens-Johnson szindrómát, valamint a súlyosabb toxikus epidermális nekrolízist) okozó mellékhatásai miatt [24]. További vegyületek a harmadik generációból a WZ4002 (XIV), mely az első publikált molekula a csoportban [25], valamint az avitinib (AC0010) (XV), a nazartinib (EGF816) (XVI) és a PF-06747775 (XVII), melyek a fejlesztés korai fázisában tartanak, és fázis I/II vizsgálatok zajlanak velük [9, 15, 22, 26].

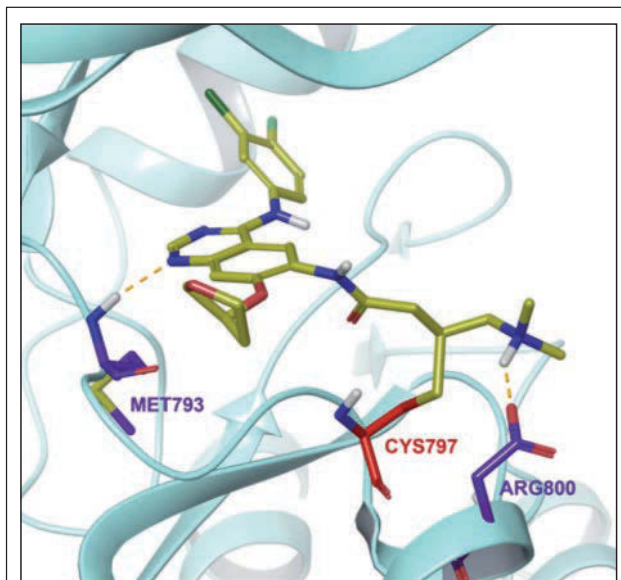
A vegyületek mindegyike akrilamid- vagy módosított akrilamid-csoportot tartalmaz, valamint felfedezhetők a reverzibilis kötődésben szerepet játszó elemek, a N-tartalmú heterociklus és az ah-



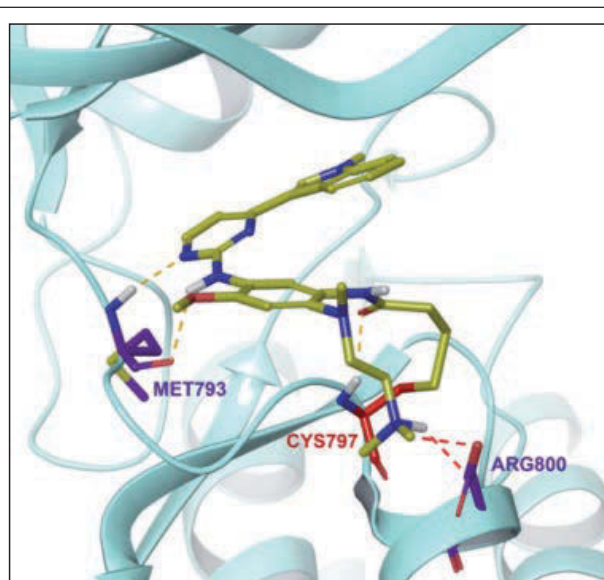
a T790M formán [15]. Ennek következtében az epiteliális sejtekre toxicitást mutatnak [21], alkalmazásuk esetén ezért gyakran jelentkezik mellékhatásként súlyos bőrkiütés és hasmenés, valamint tüdőgyulladás, me-



10. ábra: Az ibrutinib kötődése a BTK-hoz a 481-es ciszteinen keresztül (PDB ID: 5FBO) [32]



11. ábra: Az afatinib kovalens kötődése az EGFR-hez (PDB ID: 4ZAU) [16]



12. ábra: Az osimertinib kovalens kötődése az EGFR-hez (PDB ID: 4ZAU) [16]

hoz kapcsolódó szekunder aminocsoport, illetve több molekula esetén a metoxi-szubsztituens és a heterociklus lipofil oldalcsoportja is megjelenik.

### Engedélyezett kovalens gátlók

Jelenleg három kovalens gátlószer, az ibrutinib (XVIII), az afatinib (V) és az osimertinib (XII) rendelkezik FDA-engedéllyel. Mindegyik vegyületet nagy előrelépésként tartják számon a kinázgátlókkal végzett daganatterápiában. A dél-koreai engedéllyel rendelkező, és az FDA által „áttörést hozó” státuszt kapott [27] olmutinib jövője a kedvezőtlen mellékhatások jelentkezése és a gyógyszer övező fordulatot jogszerű események miatt kétséges [28, 29]. A három engedélyezett vegyület kovalens kötődési módját a Schrödinger Suites 2015-3 szoftver segítségével ábrázoltuk.

Az ibrutinib a Bruton-féle tirozin-kináz (BTK) gátlószer, mely csoportnak az első sikeres tagja. B-sejtes limfómák terápiájaként került forgalomba 2013-ban. Célcímét 0,5 nM koncentráció-tartományban gátolja, és bár néhány további kinázra is 10 nM alatti  $IC_{50}$  értéket mértek [30], a klinikai vizsgálatok során egy jól tolerálható vegyületnek találták, mérsékelt mellékhatásprofilal. Hatását monoterápiában és kombinációban is vizsgálták, és vizsgálják jelenleg is, B-sejtes limfómák egyes típusaiban szenvedő betegeken. Az eredmények alapján az ibrutinib tűnik a leghatásosabb ágensnek krónikus limfoid leukémia (CLL), kis limfocitás limfóma (SLL) és köpenysejtes limfóma (MCL) kezelésére [31].

Az afatinib jelentős gátló hatást mutat az EGFR több mutáns formájára, valamint a vad típusra: *in vitro* vizsgálatok során az EGFR(L858R)-t 0,2-0,4 nM körüli értéknél, a vad típusú EGFR-t 0,5 nM, az EGFR(L858R/T790M) kettős pontmutáns formát pedig 9-10 nM koncentrációban gátolja [18, 33]. A vegyület továbbá az exon 19-deléciót tartalmazó mutáns EGFR-re is aktivitást mutat [34]. 2013-ban kapott FDA-engedélyt, EGFR-mutációpozitív, áttétet adó nem kisesejtes tüdőrákban jelenleg első vonalbeli szerként alkalmazzák több, mint 60 országban [35, 36]. A klinikai vizsgálatok során és újabb metaanalízisek alapján az afatinib előnyösebbnek bizonyult az első generációs inhibitorokkal, az erlotinibbel és a gefitinibbel szemben, mely előny a mutációt hordozó betegeknél még szembetűnőbb [33, 34].

A legújabb kovalens inhibitor jelenleg a piacon az osimertinib. Két fő aktív metabolitja az indolgyűrű nitrogénjén demetilézett származéka, az AZ5104, valamint a dimetilamino-csoporton demetilézett AZ7550; mindkét származék az anyavegyületéhez hasonló aktivitással rendelkezik, relatív AUC értékük 10-10% körüli. Az osimertinib és metabolitjai a mutáns kinázokat 1-50 nM, illetve egyes mérések alapján ennél is alacsonyabb koncentrációban gátolják, az EGFR(L858R), EGFR(del19) és EGFR(L858R/T790M) mutáns sejtvonalakon mért  $IC_{50}$  értékei a 3-30 nM tartományba esnek, továbbá az EGFR(del19/T790M) típuson 2-16 nM koncentrációban aktívak. Az EGFR(wt) enzimén és a vad típust kifejező sejtvonalakon csak 1-3 nagyságrenddel nagyobb mennyiségben

mutatnak gátló hatást. Ezen felül a hatóanyag és metabolitjai minimális szintű „off-target” reaktivitást mutatnak a 280 egyéb kinázon meghatározott szelektivitási vizsgálat alapján [34, 37].

A gyógyszer szintén előrehaladott, illetve áttétet adó NSCLC terápiájára kapta meg az engedélyt, és nagy remények fűződnek hozzá, mint a klasszikus EGFR-gátlókra kialakuló rezisztenciát okozó T790M mutáns forma hatásos ellenszere. Ezt bizonyítja, hogy jelenleg 50-nél is több fázis I, II és III klinikai vizsgálat zajlik a hatóanyaggal, monoterápiában vagy egyéb gyógyszerekkel kombinációban, többségében mutációt hordozó, NSCLC-ben szenvedő betegeken, és több vizsgálatot kifejezetten a korábban már más EGFR-gátlóval kezelt, de arra rezisztenciát szerző betegek csoportjain végeznek [9, 23, 38].

### Kovalensen kötődő vegyületek modellezése

A bioinformatika fejlődése a huszonegyedik században új eszközöket szolgáltatott a racionális gyógyszertervezés megújulásához. A molekula-modellező programoknak köszönhetően ma már lehetőségünk van egyebek mellett fehérjék és más makromolekulák teljes szerkezetének megjelenítésére, gyógyszervegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak és ADME sajátságainak *in silico* előrejelzésére, valamint célnzimhez kötődésük módjának energetikai és farmakodinámiai jellemzésére. Ez utóbbi funkció a dokkolás, mely bonyolult matematikai algoritmusok segítségével állapítja meg a vizsgált vegyület energetikailag legkedvezőbb konformációját a célnzim kötőhelyéhez történő kapcsolódása során.

Az általunk használt molekula-modellező szoftver a Schrödinger Suites 2015-3. A program Glide nevű modulja használható egy potenciális vezérmolekula („lead”) meghatározására, annak HTVS (high-throughput virtual screening) funkciójával. Lehetőségünk van egy már meglévő „lead” molekula optimalizálására is: különbözően szubsztituált analóg vegyületeket a program által becsült kötődési affinitásuk alapján rendszerezhetjük, és megállapíthatjuk a modell segítségével, mely funkciós csoportok, molekulaszervezeti elemek szükségesek a sikeres kötődéshez. A dokkolás egy reverzibilis komplex modellt eredményez, amely megjeleníti a ligandum és a fehérje kötőhelye között kialakuló másodlagos kölcsönhatásokat: hidrogénkötéseket, Van der Waals-kötéseket, ionpárokat,  $\pi$ - $\pi$  és  $\pi$ -ion kölcsönhatásokat. A vegyület szolvatációjának energiamérlegét is figyelembe veszi a program a

dokkolás végeredményének számolásakor, melyet kcal mol<sup>-1</sup> mértékegységben kapunk meg [39, 40].

A Glide dokkolás hasznos eszköz a vegyületek kötődési tulajdonságainak és affinitásának jellemzésére, azonban az enzimhez irreverzibilisen kapcsolódó vegyületek kötődési módját nem képes bemutatni. Ma már lehetőségünk adódik a közel-múltban egyre növekvő jelentőségű kovalens hatóanyagok hatásmechanizmusának elmélyültebb tanulmányozására is a CovDock modul segítségével. A Glide dokkolás során megállapításra került reverzibilis komplex szerkezetét felhasználva kiválasztjuk a dokkolt vegyületet és a reaktív oldallánccal rendelkező aminosavat, melyen a kovalens kötődés létrejön. A szoftver első lépésben a kiválasztott aminosavat (esetünkben a kináz reaktív ciszteinjét) alaninná változtatja, hogy a „warhead” térközeltségbe kerülhessen azzal, majd hozzáadja a reaktív oldalláncot, és kötést képez a ligandum és az adott aminosav között. A folyamat több kovalens komplexet eredményez a ligandum konformációjának függvényében, melyek közül az összeített dokkolási eredmény alapján a legkedvezőbb (azaz a legnegatívabb kcal mol<sup>-1</sup> értékkel rendelkező) kerül kiválasztásra [41, 42].

A kovalens dokkoláshoz ki kell választani a megfelelő kötődési hatásmechanizmust a vegyületek reaktív csoportjaitól függően. A CovDock megadott beállításokkal rendelkezik például ciszteinek között kialakuló diszulfidhíd modellezésére, Michael-akceptorok reakciójára ciszteinekkal, nukleofil addícióra kettős- vagy hármaskötéshez, iminkondenzációra, epoxidfelnyílásra, valamint béta-laktámok, foszfonátok vagy éppen boronsavak addíciójára. A széles körben alkalmazott „warheaddel” rendelkező vegyületek kovalens dokkolása így könnyen kivitelezhető.

Kutatócsoportunk egy daganatok kialakulásában szerepet játszó intracelluláris tirozin-kinázt gátló vegyületcsalád fejlesztésén dolgozik, melyek szerkezete jelen cikkben nem kerül bemutatásra. Az enzim több támadható ciszteinnel is rendelkezik kötőhelyén, valamint annak közelében. Az előállított anyagok néhány tagja szubmikromólos koncentrációban gátolja a célpontját (IC<sub>50</sub> = 300-600 nM), valamint az enzimet kifejező mutáns sejtvonalat (IC<sub>50</sub> = 240-540 nM). A vegyületcsalád egy, a csoportunk korábbi kutatása során fejlesztett, kiváló szelektivitási profillal rendelkező hatóanyagcsalád alapvázon módosított analógjai. Az új vegyületek kisszámú heteroatom és funkciós csoport mellett tartalmaznak egy elektronszegény környezetű kettőskötést. Feltételezésünk alapján e kettős-



kötés megfelelő reaktivitással rendelkezik a kötőhely ciszteinjéhez való kovalens kapcsolódáshoz, mely magyarázatot szolgáltatna a nanomólos tartományban jelentkező gátló hatásra és a szelektivitásra.

Hogy megjelenítsük a feltételezett kovalens komplex szerkezetét, igyekeztünk a vegyületeket a CovDock segítségével dokkolni. Mivel a vegyületek nem tipikus „warheaddel” rendelkeznek, így a program alapbeállításai nem voltak alkalmasak a reakció modellezésére. A dokkolásokhoz ezért szükségünk volt egy megfelelő .cdock kiterjesztésű fájl létrehozására, mely a reakció mechanizmusát tartalmazza, s melynek segítségével a program felismeri a kettős kötést, mint reaktív csoportot. A fájlt a CovDock hivatalos útmutatója [43], valamint egy, a Schrödinger cég honlapján fellelhető előadás [44] alapján szerkesztettük meg, mely az alábbi szöveget tartalmazza:

```
LIGAND_SMARTS_PATTERN 1,[C]=[C]-[c]
RECEPTOR_SMARTS_PATTERN 2,[C]-[S,O;H1,-1]
CUSTOM_CHEMISTRY („<1>”, („charge”, 0, 1))
CUSTOM_CHEMISTRY („<1>|<2>”, („bond”, 1, (1, 2)))
CUSTOM_CHEMISTRY („<2>=[C]-[c]”, („bond”, 1, (1, 2)))
```

A reaktív csoportok meghatározásához a SMARTS leíró nyelvet kell alkalmazni, mely segítségével pontosan lehet meghatározni molekuláris alstruktúrákat, mintázatokat atomok és kötések jelölésével. Hasonló a SMILES-hoz, de azzal ellentétben nem csak teljes molekulákat lehet ábrázolni vele, így felhasználható molekularészletek alapján történő keresésre, szűrésre vagy összehasonlításra [45, 46].

A mechanizmus fájlban meg kell adni a LIGAND\_SMARTS\_PATTERN, illetve RECEPTOR\_SMARTS\_PATTERN kulcsszavakat. Utánuk a ligandum és a célfehérje reakcióban részt vevő részletének SMARTS nyelven írt mintázatát kell

leírni, valamint elé az indexszámot, ami jelzi, hogy a SMARTS mintázat hányadik eleme a reagáló atom. Esetünkben a ligandum számára egy egyszerű vinilcsoport leírása megfelelő. Vegyületeink nem rendelkeznek a Michael-akceptorok szerkezetében megtalálható oxocsoporttal, így az alkalmazott **[C]=[C]-[c]** jelzés a Michael-akceptorok SMARTS mintázatának egyszerűsített formája. A ligandum indexszáma az **1**, tehát a **[C]=[C]-[c]** első szénatomja, a receptor indexszáma a **2**, azaz a **[C]-[S,O;H1,-1]** mintázat kén- vagy oxigénatomja.

A CUSTOM\_CHEMISTRY kulcsszó és egy utasítás alkalmazásával lehet meghatározni a továbbiakban lejátszódó lépéseket a „SMARTS mintázat”, („utasítás”, érték, indexszámok)] sémára. Így állíthatjuk be például az atomok töltésének változását (charge), a kialakuló vagy megszűnő kötések (bond), kiralitáscentrumok konfigurációjának változását (chiral), vagy távozó csoportok esetében atomok elvételét (delete). Az „<1>” jelzés a fehérje SMARTS mintázatának reakcióban részt vevő atomját helyettesíti (esetünkben **[S,O;H1,-1]**), a „<2>” pedig a ligand reagáló atomját (esetünkben **[C]**). A fájl harmadik sorában állíthatjuk be a reaktív aminosav atomjának formális töltését a „charge” szó után írva (esetünkben **0**), valamint utána az indexszámot feltüntetve (**1**, tehát „<1>”). A következő sorban állíthatjuk be a kialakuló kötés rendűségét a „bond” utasítást alkalmazva. Az „<1>|<2>” esetén a függőleges vonal jelzi, hogy a SMARTS mintázat két molekulát jelöl meg. A rendűséget **1**-re állítva egyszeres szén-kén (vagy szén-oxigén) kötést alakítunk ki, mögötte pedig feltüntetjük az indexszámokat (**1** és **2**, tehát <1> és <2>). Az utolsó sorban a ligandum SMARTS mintázatában az első és második atom (esetünkben az eredeti kettős kötés két szénatomja, <2>=**[C]**) közötti kötés rendűségét állítjuk **1**-re, mögötte ismét feltüntetve az indexszámokat (**1** és **2**, tehát <2> és **[C]**).

I. táblázat

Kovalens dokkolások eredményei kcal mol<sup>-1</sup>-ban és az anyagok célnenzimen mért IC<sub>50</sub> értékei nM-ban

	BTK	EGFR(wt)	célpont TK	IC <sub>50</sub> (nM)
ibrutinib	-9,524	-	-	0,5
afatinib	-	-8,584	-	0,5
AZ5104	-	-8,195	-	25
osimertinib	-	-8,144	-	184
AZ7550	-	-7,500	-	519
1. vegyület	-	-	-8,777	326
2. vegyület	-	-	-8,639	637



Az általunk létrehozott, reakciómechanizmust tartalmazó paraméter fájl sikerrel alkalmaztuk saját vegyületeink kovalens dokkolásához. A megálapított „*cdock score*”-értékek az **I. táblázatban** láthatók, melyben összehasonlító adatként feltüntetjük a három korábban bemutatott, engedéllyel rendelkező kovalens vegyület és az osimertinib két fő metabolitjának dokkolási eredményeit, és a molekulák  $IC_{50}$ -értékeit célnzimeiken. Az eredmények alapján előállított vegyületeink valóban képesnek tűnnek tirozin-kináz célpontjuk irreverzibilis gátlására.

### A kovalens gátlók jövője: problémák és megoldások

A kovalens kinázgátlók napjainkban már szerves részét képezik a tumorelles terápianak. Rendkívül potens vegyületek, és irreverzibilis hatásukat ideális esetben csak a célnzimeken fejtik ki, ezért racionális gyógyszertervezés és a tudomány legmodernebb eszközeinek segítségével reményt adnak a „Magic Bullet”-koncepció megközelítésére. A ciszteineket célzó hatásmechanizmus kiváló lehetőség a vegyületek szelektivitásának és affinitásának növelésére, azonban az egy családba tartozó kinázok evolúciósan konzervált kötőhelyén hasonló pozíciót foglalhat el az adott nukleofil. Ennek köszönhetően előfordul, hogy egy kovalens gátló nagyfokú szelektivitást mutat célnzimére, ám azon kívül néhány másik kinázt is hasonlóan kis koncentrációban képes gátolni. Bár mérsékelt reakciókészséggel és kedvező szelektivitási profillal rendelkeznek, nem zárható ki az egyéb tiolcsoportot tartalmazó entitásokhoz való kötődés, és ezáltal idioszinkráziás tünetek megjelenése. Mindezek mellett a kovalens vegyületek vitathatatlan előnnyel rendelkeznek a reverzibilis inhibitorokkal szemben [15].

A harmadik generációs EGFR-gátlók több képviselője is biztató eredményeket szolgáltatott a korábban kinázgátlóval kezelt, de arra rezisztenciát szerző betegeknél, azonban újabb problémaforrást jelent az ezen vegyületek alkalmazása során jelentkező rezisztencia. Ennek oka az akrilamid támadáspontjának, a 797-es ciszteinnek a pontmutációja, mely következtében a vegyületek alkalmazatlanná válnak a mutáns enzim irreverzibilis gátlására [47]. Az osimertinibbel kezelt betegek gyógyszerre adott válaszkészségének romlása jelenleg megoldatlan probléma, azonban több publikáció is született az elmúlt két évben, melyek ígéretes eredményekről számolnak be. A briga-

tinib reverzibilis ALK (anaplasztikus limfóma kináz) és EGFR-gátló, melyet idén áprilisban engedélyezett az FDA ALK-pozitív, áttétet adó NSCLC indikációban, crizotinibre már nem reagáló, vagy arra intoleráns betegek számára [48]. A vegyület EGFR-ellenes antitesttel (cetuximab vagy panitumumab) kombinációban való alkalmazása *in vitro* és *in vivo* is képes gátolni a hármas mutáns EGFR(C797S/T790M/L858R) enzimet, és az azt kifejező Ba/F3 sejtvonal szaporodását [49]. Hasonlóan jó eredmények születtek az EAI045 nevű allosztérikus inhibitor és cetuximab egyidejű adásával, mely szintén gátolni képes a hármas mutáns formát, és genetikailag módosított egerek tumorméretének csökkenése igazolta a kombináció hatásosságát *in vivo* is [50].

A monoterápia hatástalansága esetén, ahogy ez utóbbi két példa is mutatja, lehetőség van a kombinációs terápia alkalmazására. Jóllehet, a kinázgátlók önmagukban nem nyújtanak teljes megoldást egyes daganattípusok leküzdésében, azonban egyéb tumorelles gyógyszerek, például monoklonális antitestek kiegészítő kezeléseként használhatók, és a szinergista hatásmód következtében a gyógyszerek individuális adagja csökkenthető. A kombináció előnye továbbá, hogy a két különböző gyógyszerre kialakuló rezisztencia okai eltérőek lehetnek, így ha az egyik hatása csökken, azt ellensúlyozni képes a másik.

Érthetően nagy a hangsúly az EGFR-gátlókon, hiszen e receptor rendellenességei állnak számos daganat kialakulásának hátterében. Hogy mit tartogat a jövő a kovalens kinázgátlók fejlesztése szempontjából, egyelőre kérdés, azonban, az egyedülálló BTK-gátló ibrutinib példáját véve alapul, számos lehetőség kínálkozik a fejlesztésükre. Több onkogenezisben szerepet játszó kinázra még nem fejlesztettek ki terápianban sikeresen alkalmazható molekulát, és ezen kinázok között akadnak olyanok, melyek támadható ciszteinnel rendelkeznek [8]. Az engedélyezett kinázgátló molekulák számának folyamatos növekedése alapján így feltételezhető, hogy a közeljövőben újabb kovalens gátlószerekről szóló publikációkkal találkozhatunk a szakirodalomban.

### IRODALOM

1. Wu, P., Nielsen, T.E., Clausen, M.H.: Trends Pharmacol Sci, 36(7), 422-439 (2015).
2. Wu, P., Nielsen, T.E., Clausen, M.H.: Drug Discov Today, 21(1), 5-10 (2016).
3. <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/default.htm> [2017.05.09.] New Drugs at FDA: CDER's New Molecular Entities and New Therapeutic Biological Products.

4. Lamontanara, A.J., Gencer, E.B., Kuzyk, O., Hantschel, O.: *Biochim Biophys Acta*, 1834, 1449–1459 (2013).
5. Ullivi, P.: *Int J Mol Sci*, 17(7), 1186 (2016).
6. Carmi, C., Mor, M., Petronini, P.G., Alfieri, R.R.: *Biochem Pharmacol*, 84(11), 1388–1399 (2012).
7. Basu, D., Richters, A., Rauh, D.: *Bioorg Med Chem*, 23(12), 2767–2780 (2015).
8. Zhao, Z., Liu, Q., Bliven, S., Xie, L., Bourne, P.E.: *J Med Chem*, 60(7), 2879–2889 (2017).
9. <https://clinicaltrials.gov/> [2017.05.05.]
10. Krekó, M.: Szakdolgozat, Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Kémiai Intézet (2017).
11. Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A., Whitty, A.: *Nat Rev Drug Discov*, 10(4), 307–317 (2011).
12. Schwartz, P.A., Kuzmic, P., Solowiej, J. et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(1), 173–178 (2014).
13. Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-Santagata, D. et al.: *Sci Transl Med*, 3(75), 75ra26 (2011).
14. Liu, Q., Sabnis, Y., Zhao, Z. et al.: *Chem Biol*, 20(2), 146–159 (2013).
15. Cheng, H., Nair, S.K., Murray, B.W.: *Bioorg Med Chem Lett*, 26(8), 1861–1868 (2016).
16. Kötődési modellünk a Schrödinger Suites 2015-3 és az EGFR kináz domén kristályszerkezetének (Protein DataBank ID: 4ZAU) felhasználásával.
17. Rixe, O., Franco, S.X., Yardley, D.A. et al.: *Cancer Chemother Pharmacol*, 64(6), 1139–1148 (2009).
18. Hirsh, V.: *BioDrugs*, 29(3): 167–183 (2015).
19. Tsou, H.R., Mamuya, N., Johnson, B.D. et al.: *J Med Chem*, 44(17), 2719–2734 (2001).
20. Lanning, B.R., Whitby, L.R., Dix, M.M. et al.: *Nat Chem Biol*, 10(9), 760–767 (2014).
21. Cervenak, L., Örfi, L. et al.: *J Recept Sig Transd*, 29(2), 75–83 (2009).
22. Liao, B.-C., Lin, C.-C., Lee, J.-H., Yang, J. C.-H.: *J Biomed Sci*, 23, 86 (2016).
23. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/208065s006lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208065s006lbl.pdf) [2017.05.05.] TAGRISO® (osimertinib) tablets, for oral use.
24. <http://www.koreaherald.com/view.php?ud=20161003000241> [2017.05.05.] Bleak future for Hanmi's new lung cancer drug amid safety concerns.
25. Sakuma, Y., Yamazaki, Y., Nakamura, Y. et al.: *Lab Invest*, 92(3), 371–383 (2012).
26. Xu, X., Mao, L., Xu, W., et al.: *Mol Cancer Ther*, 15(11), 2586–2597 (2016).
27. Kim, E.S.: *Drugs*, 76(11), 1153–1157 (2016).
28. <https://www.boehringer-ingelheim.com/press-release/boehringer-ingelheim-returns-development-commercial-rights-olmutinib-hanmi> [2017.05.05.] Boehringer Ingelheim returns development and commercial rights of olmutinib to Hanmi Pharmaceutical.
29. <http://www.koreaherald.com/view.php?ud=20170417000902> [2017.05.05.] Hanmi charged with belated reporting of new lung cancer drug's side effect.
30. Honigberg, L.A., Smith, A.M., Sirisawad, M. et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(29), 13075–13080 (2010).
31. Akinleye, A., Chen, Y., Mukhi, N., Song, Y., Liu, D.: *J Hematol Oncol*, 6, 59–67 (2013).
32. Kötődési modellünk a Schrödinger Suites 2015-3 és a Bruton-féle tirozin-kináz kristályszerkezetének (Protein DataBank ID: 5FBO) felhasználásával.
33. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/human/002280/WC500152394.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002280/WC500152394.pdf) [2017.05.09.] CHMP assessment report, Giotrif, International non-proprietary name: afatinib, Procedure No. EMEA/H/C/002280
34. Hirano, T., Yasuda, H., Tani, T. et al.: *Oncotarget*, 6(36), 38789–38803 (2015).
35. <https://www.boehringer-ingelheim.com/press-release/giotrif-afatinib-approved-europe> [2017.05.08.] Giotrif® (afatinib) approved in Europe as new oral treatment option for patients with squamous cell carcinoma of the lung.
36. [https://www.boehringer-ingelheim.de/sites/de/files/Documents/GIOTRIF\\_aproval\\_map\\_3.0.pdf](https://www.boehringer-ingelheim.de/sites/de/files/Documents/GIOTRIF_aproval_map_3.0.pdf) [2017.05.08.] GIOTRIF®/GILOTTRIF® (afatinib\*); now approved in over 60 countries worldwide, widening therapy options for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients.
37. Cross, D.A., Ashton, S.E., Ghiorghiu, S. et al.: *Cancer Discov*, 4(9): 1046–1061 (2014).
38. Shuhang, W., Shundong, C., Delong, L.: *J Hematol Oncol*, 9, 34–40 (2016).
39. <https://www.schrodinger.com/glide> [2017.05.09.] Glide, A complete solution for ligand-receptor docking.
40. Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P. et al.: *J Med Chem*, 49(21), 6177–6196 (2006).
41. <https://www.schrodinger.com/covdock> [2017.05.09.] CovDock, An all-in-one workflow for pose prediction and scoring of covalently bound ligands.
42. <https://www.schrodinger.com/newsletters/introducing-covdock-covalent-docking> [2017.05.08.] Introducing CovDock for Covalent Docking
43. Schrödinger, LLC.: Covalent Docking User Manual, Chapter 5, 21–24. 222 Third Street, Suite 2230, Cambridge, MA 02142, USA.
44. [https://www.schrodinger.com/sites/default/files/toledowarshaviak\\_covdock\\_102314.pdf](https://www.schrodinger.com/sites/default/files/toledowarshaviak_covdock_102314.pdf) [2017.05.08.] CovDock for Covalent Docking (Warshaviak, D.T.)
45. <http://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.smarts.html> [2017.05.09.] SMARTS - A Language for Describing Molecular Patterns
46. [http://semmelweis.hu/orgchem/files/2017/03/SZVI-2017\\_II\\_Keminformatikabevezeto.pdf](http://semmelweis.hu/orgchem/files/2017/03/SZVI-2017_II_Keminformatikabevezeto.pdf) [2017.05.09.] Keminformatika (Mátyus, P., Balogh, B.)
47. Wang, S., Tsui, S.T., Liu, C., Song, Y., Liu, D.: *J Hematol Oncol*, 9(1), 59 (2016).
48. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm555841.htm> [2017.05.08] Brigatinib
49. Uchibori, K., Inase, N., Araki, M. et al.: *Nat Commun*, 8, 14768 (2017).
50. Jia, Y., Yun, C.H., Park, E. et al.: *Nature*, 534(7605), 129–132 (2016).

## Innovatív technológiájú ciprofloxacín-hidroklorid tartalmú száraz porinhalációs rendszer fejlesztése

BENKE EDIT, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA, AMBRUS RITA\*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet,  
Szeged, Eötvös u. 6. -6720

\*e-mail: arita@pharm.u-szeged.hu

### Summary

E. BENKE, P. SZABÓNÉ RÉVÉSZ, R. AMBRUS.: *Development of ciprofloxacin hydrochloride containing dry powder inhalation system with an innovative technology*

**Introduction:** There are different types of dry powder inhalation systems (DPIs) called traditional (carrier-based) and new generation (carrier-free) formulations which are used throughout industrial production and development works. However application of newer formulations could offer new development trend in this field.

**Aim:** The aim of the experimental work was the development of an innovative technology (application of spray-dried drug on the modified surface of carrier) to reach DPI containing antibiotic (ciprofloxacin hydrochloride) with the advantageous properties of carrier-based and carrier-free systems, therefore resulted high lung deposition.

**Method:** Interactive physical mixtures were prepared by controlled conditions using lactose for inhalation, raw and spray-dried ciprofloxacin hydrochloride. Surface modification by magnesium stearate was also applied. The prepared samples were characterized by physico-chemical and dosage form investigations.

**Results:** The surface modification and the applied innovative technology resulted high lung deposition. Investigation of interparticulate interaction a correlation between the physico-chemical properties and lung deposition results of DPIs.

**Conclusion:** According to our results it could be concluded, that there is reason for application. The prepared samples presented nearly the same lung deposition (~70%) like the new generation DPIs.

**Keywords:** DPI, combined formulation, interparticulate interactions, surface modification of carrier, ciprofloxacin hydrochloride

### Összefoglalás

**Bevezetés:** Jelenleg a száraz porinhalációs rendszerek (DPI, dry powder inhaler) esetén hordozó alapú és új generációs (hordozómentes) rendszereket állítanak elő gyári, illetve kísérleti fázis szintjén is. Érdemes megvizsgálni más formulációk, összetételek megvalósíthatóságát, új fejlesztési irányvonalat indítva ezen a területen.

**Célkitűzés:** Az experimentális munka célja olyan innovatív formulálású, antibiotikum (ciprofloxacín-hidroklorid) tartalmú DPI készítmény fejlesztése (porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása hordozó felületén), amely magába ötvözi a klasszikus hordozó alapú és az új generációs DPI rendszerek előnyös tulajdonságait, kiemelkedő tüdődepozíciót eredményezve. További célunk összefüggések keresése az előállított termékekben fellépő interpartikuláris kölcsönhatások és a tüdődepozíciós eredmények között.

**Módszerek:** Kontrollált körülmények között interaktív fizikai keverékeket állítottunk elő inhalációs laktóz, valamint kezeletlen és porlasztva-szárazított ciprofloxacín-hidroklorid esetében is. Magnézium-sztearáttal felületmódosított hordozót tartalmazó termékeket egyaránt készítettünk. A mintákat fizikai-kémiai vizsgálatokkal és gyógyszerforma-vizsgálattal jellemeztük.

**Eredmények:** Innovatív formulálás alkalmazásával legfőképp a felületmódosított terméknél sikerült figyelemre méltó tüdődepozíciós eredményt elérnünk. Interpartikuláris kölcsönhatások vizsgálata révén összefüggést találtunk az interaktív fizikai keverékek fizikai-kémiai tulajdonságai és tüdődepozíciós eredményei között.

**Következtetések:** Az eredmények alapján megállapítható, hogy a innovatív formulálású DPI készítmények fejlesztésének van létjogosultsága. Az előállított mintáink figyelemre méltó tüdődepozíciós eredményei (~70%) felveszik a versenyt az új generációs DPI készítményekével.

**Kulcsszavak:** száraz porinhalációs rendszerek, innovatív formulálású DPI, interpartikuláris kölcsönhatások, hordozó felületmódosítása, ciprofloxacín-hidroklorid

### 1. Bevezetés, az experimentális munka célkitűzése

Formulálásuk tekintetében a DPI készítmények hagyományos hordozó alapú, valamint hordozómentes (új generációs) rendszerek lehetnek. A forgalomban – egy-két kivételtől eltekintve – a hagyományos formulálású készítmények találhatók

meg. A nagyméretű hordozók felhasználása előnyös olyan hatóanyagoknál, amelyek erős kohezióval bírnak, pozitívan befolyásolja a termék folyási tulajdonságait, kis mennyiségű hatóanyag dozírozhatósága pontosítható, illetve az inhaláció során a szájüregben deponálódott hordozó íze megerősíti a betegben a termék sikeres használatának tényét. Viszont az ilyen formulálású termékek (gyári készítmények) többsége



még alacsony tüdődepozíciós értékekkel rendelkeznek (~20-30 %-os FPF, finom részecske frakciós érték), tehát a hatóanyag kis százalékban éri csak el a tüdő megfelelő szegmenseit, mert a nagyméretű hordozón maradt jelentős mennyiségű farmakon a felső légutakban kitapad. A hagyományos száraz porinhalációs rendszerek esetén fellépő interpartikuláris kölcsönhatásokkal kevés tanulmány foglalkozik nemzetközi szinten is, pedig ezek alapvető befolyással rendelkeznek a készítmények pulmonális depozíciójára vonatkozóan [1].

Az új generációs DPI rendszerek tekintetében *megfelelő segédanyagok és technológiai megoldások* – elsősorban porlasztva szárítás – *alkalmazásával* a nagyméretű hordozók felhasználása kiküszöbölhetővé vált. Viszont, ezen rendszerek is csak hozzávetőleg 50-60%-os FPF eredményekkel rendelkeznek, a hatóanyag szemcsék között kialakuló, kimutathatóan magas kohezív sajátságok miatt [1-3].

Az antibiotikumok alkalmazása tüdőfibrózis kezelésében már régre visszanyúlik, ugyanis az Abbot Laboratories már 1948-ban kifejlesztette a penicillin por tartalmú inhalációs aerohalert. A bakteriális légúti fertőzések leggyakoribb kezelési módját jelenleg is az egyszeri vagy kombinált antibiotikumok nagy dózisainak orális beadása jelenti, amelyek súlyos mellékhatásokkal járhatnak. Az antibiotikum tartalmú DPI rendszerek fejlesztésével ezen betegségek lokális kezelése válik lehetővé. Így a tüdőszövetben magas hatóanyag-koncentráció érhető el, kisebb dózisok alkalmazása elegendő az orális terápiához képest, csökkent szisztémás antibiotikum expozícióval és alacsonyabb toxicitási kockázattal is számolhatunk [4].

Munkánk célja olyan innovatív formulálású, antibiotikum tartalmú DPI készítmény fejlesztése (porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása hordozó felületén), amely magába ötvözi a klasszikus hordozó alapú és az új generációs DPI rendszerek előnyös tulajdonságait, kiemelkedő tüdődepozíciós eredményt mutatva. Ezáltal innovatív formulálású DPI rendszer előállítását terveztük ciprofloxacin-hidroklorid felhasználásával, magas tüdődepozíciós eredmények elérése érdekében. Továbbá azonos előállítási paraméterek mellett mikronizált ciprofloxacin-hidroklorid alkalmazásával referencia minták előállítását végeztük a vizsgálati eredmények megfelelő kiértékelhetősége szempontjából. Célunk a fentebb említett forgalomban levő DPI-k FPF értékeinek meghaladása és összefüggések keresése az előállított termékekben fellépő interpartikuláris kölcsönhatások és a tüdődepozíciós eredmények között.

## 2. Alkalmazott anyagok

Az experimentális munka során *ciprofloxacin-hidroklorid* (Cip-HCl) (Teva Gyógyszergyár Zrt., Debrecen, Magyarország) tartalmú összetételeket állítottunk elő pulmonális gyógyszerbevitel céljából. A Cip-HCl hatástanilag a fluorokinolinok csoportjába tartozó antibiotikum. Hatását a DNS giráz enzim és a topoizomeráz IV gátlásával éri el. Hatásos Gram pozitív baktériumok, pl. *Staphylococcus*, *Bacillus* fajok és a legtöbb Gram negatív mikroorganizmus, pl. *Pseudomonas* fajok ellen is. Kutatócsoportunkban, illetve nemzetközi szinten is fejlesztés alatt állnak ciprofloxacin alapú DPI készítmények cisztás fibrózisban szenvedő betegek krónikus tüdőfertőzésének kezelésére [4, 5].

Nagyméretű hordozóként  $\alpha$ -laktóz-monohidrátot alkalmaztunk. Gyári készítmények vonatkozásában – egy-két kivételtől eltekintve – csak laktóz felhasználásával előállított hordozó alapú forgalmazott készítményekkel találkozhatunk [1]. Felhasználhatóságát alátámasztotta, hogy orális készítmények segédanyagaként már régóta használt, tehát biztonságos és megfelelő stabilitási profillal rendelkezik. A legnagyobb százalékban a szájüregben és a torokban deponálódik nagy mérete révén. A nyálban jelenlevő bakteriális enzimek által hidrolizálódik vagy lenyelés esetén a bél enzimjei metabolizálják. A tüdőbe lejutott laktóz szemcsék gyorsan felszívódnak, majd metabolizálódnak, végül a vizelettel ürülnek [6]. Az általunk felhasznált Inhalac® 70 (IH 70) (MEGGLE Group, Wasserburg, Németország) magas minőségű, megfelelő mikrobiológiai tisztaságú kritályos laktóz, amely kifejezetten DPI-ok segédanyagaként használatos [7].

A nagyméretű hordozó felületének kezeléséhez *magnézium-sztearátot* (MgSt) (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) vettünk igénybe. Szilárd gyógyszerformák esetében (pl. tabletták) lubrikánsként/kenőanyagként;/ glidánsként és antiadhezív tulajdonsága révén széles körben alkalmazott segédanyag. Tanulmányok bebizonyították, hogy száraz porinhalációs készítményekben is van segédanyagként létjogosultsága. Hordozó alapú DPI termékekben hozzájárul a por áramlásának javulásához, az interpartikuláris kölcsönhatásokat kedvezően befolyásolja, illetve elősegíti a farmakon szemcsék felszabadulását és diszperzióját a nagyméretű hordozó felületéről. Továbbá az is bebizonyosodott, hogy magas páratartalom esetén javítja a DPI készítmény nedvességgel szembeni ellenállását [8]. A tüdő mélyebb szegmenseibe csak jelentéktelen mennyiségű magné-



zium-sztearát jut le, amely nem jár negatív hatásokkal [9]. A fentebb említett kedvező tulajdonságai révén a magnézium-sztearát felhasználását segédanyagként jóváhagyták inhalációs terápiában való alkalmazásra [10]. A Magyarországon forgalmazott DPI-ok közül az *Anoro*<sup>®</sup> (Glaxo Group Ltd.), a *Foster*<sup>®</sup> *Nexthaler*<sup>®</sup> (Chiesi Pharmaceuticals GmbH), az *Incruse*<sup>®</sup> (Glaxo Group Ltd.), a *Relvar*<sup>®</sup> *Ellipta*<sup>®</sup> (Glaxo Group Ltd.), a *Seebri*<sup>®</sup> *Breezhaler*<sup>®</sup> (Novartis Europharm Ltd.) és az *Ultibro*<sup>®</sup> *Breezhaler*<sup>®</sup> (Novartis Europharm Ltd.) inhalációs porok tartalmazznak magnézium-sztearátot [11]. A megnevezett készítményeket mind az utóbbi öt évben engedélyezték [12].

### 3. Minták előállítása

#### *Porlasztva szárítás*

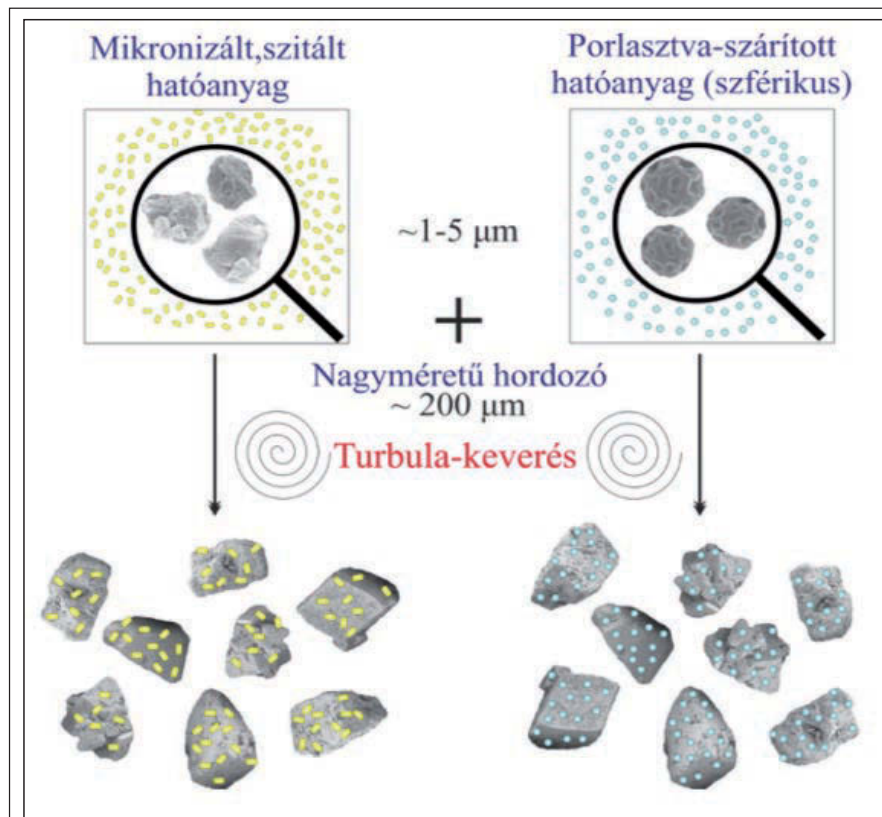
A porlasztva szárítás – mint hatóanyag mikronizálási módszer – DPI rendszerek előállítása során széles körben alkalmazott technológiai eljárás. Alkalmazásával javulnak a részecskék aerodinamikai tulajdonságai, pl. alacsonyabb sűrűség, porózusabb szerkezet, megváltozott morfológia jellemzi őket, a kiindulási szemcsékhez képest [13].

Újszerű formulálás kivitelezéséhez (porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása nagyméretű hordozó felületén) először a ciprofloxacin-hidroklorid, mint vízdékony só porlasztva szárítására volt szükség. Az adott hatóanyag 0,50 g-ját 89,5 g desztillált víz és 10,0 g 96%-os etanol elegyében oldottunk, ezáltal szem előtt tartva, hogy az etanol előnyösen befolyásolja a termékek aerodinamikáját. A porlasztva szárítás során fúvókás (pneumatikus) porlasztva szárító berendezést (Büchi Mini Spray Dryer B-191) vettünk igénybe. Kutatócsoportunk korábbi kutatási eredményei alapján az alábbi főbb beállítási paramétereket alkalmaztuk a porlasztva szárítás megvalósítására: a szárító levegő beállított hőmérséklete ( $T_{in}$ ) 140 °C. A kimenő hőmérséklet ( $T_{out}$ ) 78 °C, ami a ciprofloxacin-hidroklorid olvadáspontja alatt van. A szárító levegő áramlásának erőssége (Asp.) 75%, a mintaadagoló pumpa fordulatszáma (Pump.) 005%, a sűrített levegő áramlási sebessége (Air flow) 600 l/óra. Ezen paraméterek befolyásoló hatással bírnak a porlasztás során kialakuló részecskék méretére, morfológiájára, a szemcseméret eloszlására, a szem csék porozítására és nedvességtartalmára is.

#### *Turbula-keverés*

Turbula-keverő alkalmazásával alakítottuk ki a nagyméretű hordozóból (IH 70) és a porlasztva-szárított hatóanyagból (Cip-HCl-spd) álló innovatív formulálásnak számító interaktív fizikai keveréket. Előállítottuk az említett formuláció olyan változatát is, ahol a hordozót előzetesen magnézium-sztearáttal (MgSt) felületkezeljük. A megfelelő szemcseméret (mikronizált) alkalmazása céljából szitált (25 mikrométer fonalközi távolság), kristályos ciprofloxacin-hidroklorid (Cip. HCl-szitált) felhasználásával pedig azonos előállítási paraméterek használatával készítettünk a kiértékelés során referenciaként alkalmazott mintákat (1. ábra).

A termékek előállítási paramétereit irodalmi adatok alapján definiáltuk, így a hordozó-hatóanyag tömegarány



1. ábra: A gyári hagyományos előállításnak megfelelő (bal) és módosított habitusú (jobb) hatóanyag DPI formulálása

minden esetben 10 az 1-hez [14] volt. A hordozó előzetes felületkezelése 4 órás Turbula-keveréssel [15] történt a termékre vonatkoztatott 2% *m/m* magnézium-sztearát [16] alkalmazásával. A hatóanyag tartalmú interaktív fizikai keverékek előállítására fél óra turbulázást igényelt [17]. Az **I. táblázatban** kerülnek feltüntetésre a kísérletek során vizsgált mintáink összetételei.

#### 4. Vizsgálati módszerek

##### *Részecske méret, morfológia*

Malvern Mastersizer 2000 Scirocco (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) berendezéssel vizsgáltuk a felhasznált ható- és segédanyagok, illetve a porlasztva szárított hatóanyag szemcseméretét. Porok mérése révén száraz feltétet alkalmaztunk. A készülék a porokat (megközelítőleg 0,5 g tömegű mintákat) a levegőben aeroszollá alakítja 2,0 bar nyomáson. Az elvégzett szemcseméret meghatározást követően megszerkeszthető a szemcseméret-megoszlási görbe és a granulometriai (összeggörbe) is. A minták jellemző paraméterei a fentebb említett görbék alapján megadhatók, azaz D[0.1], D[0.5], D[0.9] az a méret ( $\mu\text{m}$ ), amelynél a részecskék 10%-a, 50%-a, 90%-a kisebb.

Pasztázó elektronmikroszkóp (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán) alkalmazásával határoztuk meg a részecskék habitusát és morfológiáját. Arany-palládiummal (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Anglia) vontuk be a vizsgált szemcséket, majd 1,3-13 mPa nyomású levegőt vettünk igénybe, a minták felületén elektromos vezetés kialakítása céljából.

##### *Szerkezeti vizsgálatok*

A fizikai sajátságok és a kristályos jelleg jellemzésére porröntgen diffrakció (XRPD, X-ray powder diffraction) vizsgálatokat alkalmaztunk. Ezen tulajdonságok mérésére Bruker D8 Advance dif-

fraktométert (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) használtunk. A sugárforrás: Cu K $\alpha$  sugárzás ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ). Egységesen 40 kV feszültségen és 15 mA áramerősségen történt a beolvasás 3°-tól 40°-ig ( $2\theta$ ), a szkennelési sebesség 0,1°/min, lépésköz pedig 0,01°. A röntgen kalibrálását szilícium koronggal végeztük. Eredményeink kiértékelésére DIFFRACT plus EVA szoftvert használtunk. A diffraktogramokat K $\alpha$ 2-vel korrigáltuk, simítottuk és alapvonal-korrekciónak elvégzése után értékeltük.

A termoanalitikai méréseket Mettler Toledo STAR<sup>e</sup> készülék (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) segítségével végeztük. A differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) méréseket argon gáz áramoltatásával (10 l/óra), 2-4 mg-os mintával 25-350 °C között, 10 °C/perc fűtési sebességgel hajtottuk végre.

##### *Nedvesedési peremszög meghatározása és a belőle számolt összefüggések*

A nedvesedési peremszög meghatározását OCA cseppkontúr analízis készülékkel (Dataphysics OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Németország) végeztük. Alapanyagok és termékek esetén is 0,10 g-ot kimérve pasztillát préseltünk 1 tonna préselővel, Specac (Specac Inc., USA) hidraulikus prést alkalmazva. Minden vizsgált mintából hat préselmenyt készítettünk. Ebből három pasztilla felületére 4,8  $\mu\text{l}$  desztillált vizet (poláris folyadékként) és a másik háromra pedig 2  $\mu\text{l}$  di-jódmetánt (diszperziós folyadékként) cseppentettünk. Így mintánként három párhuzamos vizsgálat alapján kaptuk meg a nedvesedési peremszöget a két eltérő folyadék esetén. A cseppentéssel megegyező időben a készülék segítségével másodpercenként felvettelt készítettünk 1-25 másodperces időintervallumban, így vált lehetővé a peremszög változásának detektálása, illetve meghatározása.

Wu módszere, egyenlete által válik lehetővé két eltérő folyadékban, esetünkben desztillált vízben és di-jódmetánban detektált nedvesedési peremszög ( $\Theta$ ) alkalmazásával a minták határfelületi/felületi

I. táblázat

Vizsgált mintáink összetétele tömeg alapján

Minták	Cip-HCl-szítált	Cip-HCl-spd	IH 70	MgSt
Cip-HCl-szítált	X	-	-	-
Cip-HCl-szítált+IH70	0,2 g	-	2,0 g	-
Cip-HCl-szítált+(IH70+MgSt)	-	0,2 g	1,956 g	0,044 g
Cip-HCl-spd	-	X	-	-
Cip-HCl-spd+IH70	-	0,2 g	2,0 g	-
Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt)	-	0,2 g	1,956 g	0,044 g

szabadenergiájának ( $\gamma_s$ ) kiszámolása. Az anyag felületi szabadenergiája ( $\gamma_s$ ) definíció szerint az a szabadenergia változás, amely a felület egy egységnyi növelésekor bekövetkezik. Ez két részből tevődik össze: egy diszperziós részből ( $\gamma_s^d$ ) és egy poláris részből ( $\gamma_s^p$ ), ezáltal ( $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$ ). A folyadékok felületi feszültsége ( $\gamma_l = \gamma_l^d + \gamma_l^p$ ) irodalmi adatok alapján ismert, desztillált víz esetében  $\gamma_l^d = 21,8$  mN/m,  $\gamma_l^p = 51,0$  mN/m, így  $\gamma_l = 72,8$  mN/m. Dijódmétán vonatkozásában  $\gamma_l^d = 50,8$  mN/m,  $\gamma_l^p = 0$  mN/m, ezáltal  $\gamma_l = 50,8$  mN/m. A Wu egyenletben ennek következtében már csak két ismeretlen marad: a vizsgált szilárd anyag diszperziós  $\gamma_s^d$ , illetve poláris komponense ( $\gamma_s^p$ ). Ezek kifejezhetőek két egyenletből, azaz a Wu egyenletbe behelyettesítjük a desztillált vízben mért peremszög értéket és a desztillált víz irodalmi adatait, a másik egyenletbe pedig ugyanezt elvégezve a dijódmétán esetén [18-20].

Wu egyenlete a következő [18]:

$$(1 + \cos \Theta) \gamma_l = \frac{4(\gamma_s^d \gamma_l^d)}{\gamma_s^d + \gamma_l^d} + \frac{4(\gamma_s^p \gamma_l^p)}{\gamma_s^p + \gamma_l^p}$$

ahol  $\Theta$  = a nedvesedési peremszög;  $\gamma$  = határfelületi feszültség;  $s$  = szilárd fázis;  $l$  = folyékony fázis;  $d$  = diszperziós komponens;  $p$  = poláris komponens

A felületi szabadenergia ( $\gamma_s$ ) és a poláris komponens ( $\gamma_s^p$ ) ismeretében kiszámolható a minták polaritása az alábbi összefüggés szerint [20]:

$$(\gamma_s^p / \gamma_s) * 100$$

A kohéziós munka ( $W_c$ ) egyszerűen számolható a felületi szabadenergia ( $\gamma_s$ ) kétszereseként [20]:

$$W_c = 2 * (\gamma_s)$$

A két különböző anyag (képletben 1-es és 2-es számokkal jelölve) között értelmezhető adhéziós munka ( $W_a$ ) meghatározható az eddig kiszámolt, anyagra jellemző diszperziós ( $\gamma_s^d$ ), illetve poláris komponens ( $\gamma_s^p$ ) értékekből, melyek jelen képlet esetén  $\gamma^p$ -nek, illetve  $\gamma^d$ -nek felelnek meg [20].

$$W_a = 4 \left[ \frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} \right]$$

Az adhéziós erő ( $F_{adh}$ ) meghatározására több modell is ismeretes, jelen munkánk során a

Derjaguin-féle megközelítést vettük igénybe, mely a gyógyszer technológiában rendszerint alkalmazott [18]:

$$F_{adh} = 2\pi \left( \frac{R_A R_B}{R_A + R_B} \right) W_{adh}$$

ahol  $R_A$  és  $R_B$  az A és B részecske sugara, melyek közötti adhéziós kölcsönhatást vizsgáljuk.  $R$  méretét felhasznált alapanyagonként a szemcseméret-analízis során meghatározott  $D[0.5]$  érték feleként határoztuk meg.

A szétterülési együttható ( $S_{12}$ ) azt mutatja meg, hogy az egyik anyag (1) a másik anyag felületén (2) mekkora valószínűséggel terül szét. Fordított esetben is kiszámolható. Kétkomponensű rendszerek során az eloszlás jellemzésére szolgál. Ez egy dimenzió nélküli szám. Energetikailag kedvező a szétterülés, amennyiben pozitív értékű az együttható, illetve minél nagyobb ez a szám, annál kedvezőbb szétterülést jelez. Esetünkben a hatóanyag szétterülését tudjuk jellemezni a nagyméretű hordozó felületén. Az együttható, illetve fordított esete az alábbi képletekkel számolhatóak ki [18, 20]:

$$S_{12} = 4 \left[ \frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} - \frac{\gamma_1}{2} \right]$$

$$S_{21} = 4 \left[ \frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} - \frac{\gamma_2}{2} \right]$$

ahol  $\gamma^d$  a felületi szabadenergia diszperziós része, a  $\gamma^p$  a felületi szabadenergia poláris része és  $\gamma$  a teljes felületi szabadenergiája annak a komponensnek, amelynek szétterülését vizsgáljuk a másik komponensen.

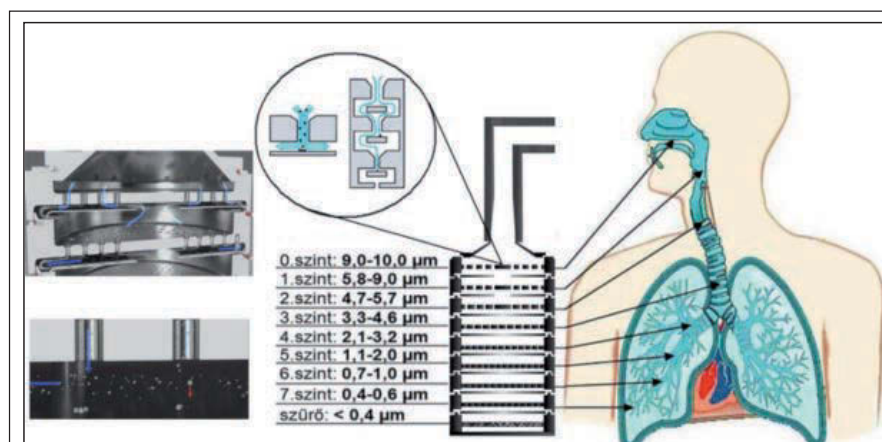
#### *In vitro aerodinamikai vizsgálat*

Minták aerodinamikai paramétereinek (FPF, MMAD) meghatározására (részletezve 5. pontban) a Copley cég (Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság) által forgalmazott Andersen-féle kaszkádimpaktort (ACI, Andersen Cascade Impactor) (2. ábra) vettük igénybe. Ez a tudómodell a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos („D” készülék). Az ACI nyolc különböző, lefelé haladva csökkenő porusátmérőjű szinttel rendelkezik és az azokon elhelyezkedő felfogótálcákkal (2. ábra). Ezzel modellezve a tudó egyre kisebb átmérőjű gene-



rációit. Az ACI-ban a vákuum-pumpa által generált, belégzést modellező levegő a készülékben szintenként nekiütközik a szinthez tartozó felfogótálcának. A tálcá és a készülék fala közti résen a levegő lentebb halad a soron levő szintre, minden szintlépés során a levegő 180-os fordulatot ír le [21, 22].

A kísérleteink során a mintákat speciális kemény zselatin kapszulába (transzparens, 3-as méret, Capsugel, Németország) mértük be [24]. A pulmonális hatóanyag bevitel esetén a farmakonok alacsonyabb dózisának alkalmazása elegendő az orális dózishoz képest, pontosabban egy tizedét alkalmazzák. Például szalbutamol esetén az orális dózis 2-4 mg felnőttek esetén, miközben az inhalációs dózis 200 µg [25]. Ebből adódóan a kapszulákba töltött mennyiségeket úgy határoztuk meg, hogy esetünkben termékenként a hatóanyagtartalom 10 mg [4] legyen. Ez a tömeg felel meg a ciprofloxacin orális dózis érték tizedének. Teszteléseink alkalmával Breezhaler® típusú inhalátort vettünk igénybe. Ebbe az eszközbe helyeztük a már megtöltött kapszulát, majd egy határozott mozdulattal a készülékbe épített tű segítségével lyukasztottuk ki azt. Így vált lehetővé a minta beinhaláltatása a tüdőmodellbe. A mérések alkalmával 60 l/perc-es áramlási sebességet és 4 másodperces belégzési időtartamot állítottunk be *in vitro* tüdődepozíciós vizsgálataink során. Minden egyes vizsgálat előtt az ACI felfogótálcáit felületaktív anyaggal vontuk be (Spam 80+ciklohexán oldat 1+99 tömegarányú elegyével), így lehetséges a többszöri beinhaláltatás a kaszkádimpaktorba anélkül, hogy a már a tálcákra előzetesen kitapadt részecskék lesodródának [26]. Az ACI szintjeire kitapadt por mennyiségek ismeretében Kaleida Graph kiértékelő program alkalmazásával határoztuk meg a számunkra fontos információt jelentő PPF és MMAD értékeket.



2. ábra: Az ACI szintjei, mérettartományok és az áramlás szemléltetése [21, 23]

II. táblázat

Részecskeméret (medián) és a belőlük számolt sugár értékek

Vizsgált anyagok	D [0.5] (µm)	R (µm)
Kezeletlen Cip-HCl	10,51	5,26
Cip-HCl-szítált	5,09	2,54
Cip-HCl-spd	1,94	0,97
IH70	215,00	107,50
MgSt	6,92	3,46
IH70+MgSt	174,32	87,16

## 5. Eredmények értékelése

### Részecske méret, morfológia

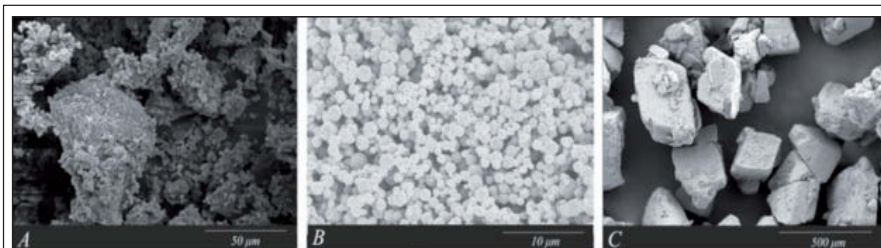
A szemcseméret analízis során D[0.5] (medián) érték meghatározása volt fontos számunkra, amely alapján értékelni tudtuk azt, hogy az alkalmazott kiindulási hatóanyagok és a porlasztva szárított minta inhalációs alkalmazásra megfelelő mérettartományban helyezkednek-e el. Továbbá D [0.5] érték feleként meghatároztuk az R (sugár) értékét a felhasznált anyagok vonatkozásában, amelynek ismeretére az adhéziós erő ( $F_{adh}$ ) kiszámításához elengedhetetlen.

A II. táblázatban feltüntetett eredmények alapján megállapítható, hogy a kezeletlen Cip-HCl, amelyből Cip-spd-t porlasztva szárítással készítettük nem felel meg az inhalációs terápia szempontjából ajánlott (~1-5 µm-es) mérettartománynak. A referenciaként vizsgált, szemcseméret optimalizálás céljából szítált hatóanyag (Cip-HCl-szítált) és a fejlesztés középpontjában álló minták alapjául szolgáló Cip-HCl-spd átlagos mérete már a követelményekhez igazodik. A szemcseméret-analízis is alátámasztja az IH 70 nagyméretű hordozó mivoltát.

A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek révén a kiindulási anyagok morfológiáját és habitusát tanulmányoztuk, a termékek vonatkozásában pedig a hatóanyag hordozó felületén való eloszlatoottságáról szerezünk ismereteket, illetve az egyedi részecskék szemcseméretéről is további információkat nyertünk.

A SEM felvételek (3. ábra) alapján megállapítható, hogy a kezeletlen Cip-HCl (A) esetén változatos alakú, egyenetlen felszínű kristályokról be-





3. ábra: Kezeletlen Cip-HCl (A), Cip-HCl-spd (B) és IH70 (C) elektronmikroszkópos felvétele

szélhetünk, amelyek pulmonális alkalmazásra nem megfelelő méretűek. Ezzel szemben a Cip-HCl-spd (B) mélyedéseket tartalmazó, szférikus morfológiájú, homodiszperz minta. Az IH 70 (C) vonatkozásában nagyméretű, sima felszínű, hasáb alakú, közel romboéder formájú szemcséket látnak.

Elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk (4. ábra) annak céljából is, hogy tanulmányozzuk, milyen módon befolyásolja a magnézium-sztearát a hordozó felszínét és ezáltal a szerepét a formulálásban. Jelentős különbséget tapasztaltunk a porlasztva szárított, szférikus morfológiájú hatóanyag hordozóhoz kötődése kapcsán, mivel felületmódosítás nélkül (A) egyenletes eloszlást, míg felületkezelés estében (B) bizonyos mértékű hatóanyag koncentrációt tapasztaltunk.

Megállapítottuk, hogy a magnézium-sztearát a hordozó aktív helyeit betöltve módosította a hatóanyag hordozó felületén való elterülését és ezáltal feltételezhetően az interpartikuláris kölcsönhatásokat is befolyásolhatja. Véleményünk szerint hatással van a nagyméretű hordozó felületének porozítására is. Felületmódosítás nélkül (A) mikropórusos (pórusátmérő 1-10 µm), felü-

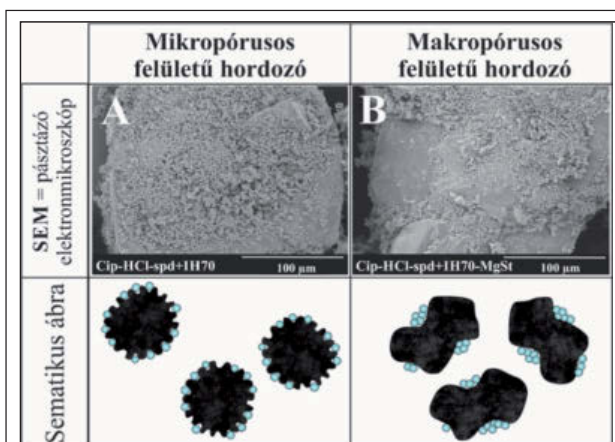
letkezelés esetén (B) makropórusos (pórusátmérő 10 µm feletti) az alkalmazott hordozó felülete. Ez is magyarázatul szolgál a tapasztalt eltérő hatóanyag elterülés jelenségére [1].

#### Szerkezeti vizsgálatok

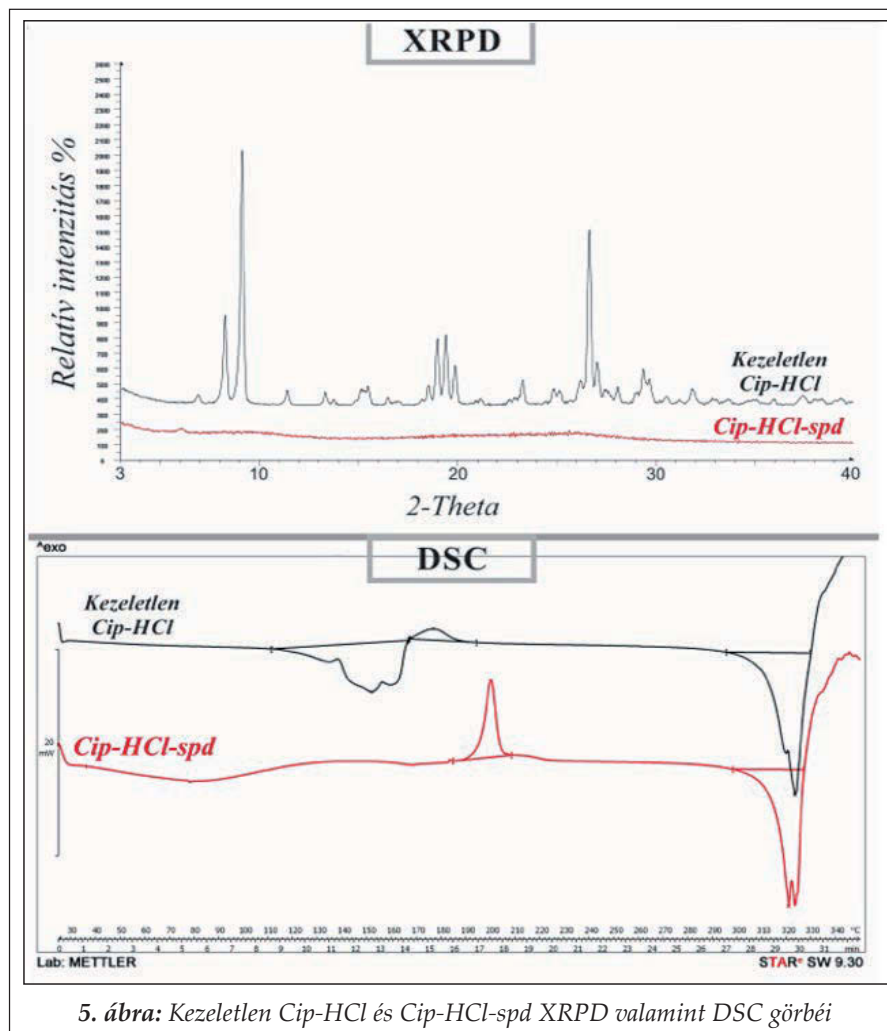
A porröntgen (XRPD) és termoanalitikai (DSC) vizsgálatok elvégzésével a termékek előállításánál alkalmazott kezeletlen Cip-HCl és a porlasztva szárított hatóanyag (Cip-HCl-spd) szerkezetéről és kristályosságának állapotáról szereztünk hasznos információkat. Az alkalmazott hatóanyagok szerkezetének ismerete meghatározó lehet az aerodinamikai viselkedés, a hatáskifejtés, a segédanyaggal való kompatibilitás, a gyógyszerforma stabilitása szempontjából is.

Az XRPD eredmények alapján (5. ábra) a kezeletlen Cip-HCl kristályos jellege alátámasztható. A kezeletlen Cip-HCl XRPD diffraktogramja számos jellemző csúcsintenzitást mutat, amelyek nagyfokú kristályosságot jelentenek, a legmagasabb intenzitású csúcs 9,09 2-theta értéknél volt detektálható. Cip-HCl-spd esetén nem figyelhetünk meg csúcsokat a porröntgen vizsgálat vonatkozásában, amely következtében megállapítható a porlasztva szárított hatóanyag amorf jellege.

A DSC görbék (5. ábra) tanulmányozása alapján elmondható, hogy a kezeletlen Cip-HCl esetében részleges amorf sajátság figyelhető meg. Először átkristályosodást látunk a termoanalitikai görbén, majd 322,68 °C-nál olvadáspontot detektáltunk, amelyet endoterm csúcs jelez. Ez megfelel a ciprofloxacin-hidroklorid szakirodalomban dokumentált olvadáspontjának [27]. A teljesen amorf anyagoknál nem olvadáspontról, hanem üvegesedési hőmérsékletéről beszélhetünk, amely egy elnyújtott hőmérsékleti tartomány, amelyen belül az anyag ellágyul. Cip-HCl-spd esetén a DSC görbén az amorf sajátságnak megfelelően hő hatására lágyulást tapasztaltunk, majd az amorf forma rekristallizálódott 200,63 °C-nál és ennek az újrakristályosodott formának az olvadáspontját detektáltuk 320,24 °C-nál. Az amorfizálás jelensége a porlasztva szárításból adódik. Tehát az XRPD és DSC vizsgálatok során tapasztaltak egyértelműen alátámasztják a kezeletlen Cip-HCl kristályos, esetleg részlegesen amorf és a Cip-HCl-spd amorf jellegét.



4. ábra: Cip-HCl-spd+IH 70 (A) és Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt) (B) elektronmikroszkópos felvétele, illetve a hordozó felületi porozításának és a hatóanyag hordozón való elterülésének sematikus ábrája



5. ábra: Kezeletlen Cip-HCl és Cip-HCl-spd XRPD valamint DSC görbéi

#### Nedvesedési peremszög meghatározása és a belőle számolt összefüggések

A 4. pontban részletezett eljárással detektáltuk az alapanyagok nedvesedési peremszögeit (**III. táblázat**) desztillált víz és dijudmetán felhasználása esetén is. A kapott értékekből a már korábban ismertett összefüggésekkel meghatároztuk az anyagok felületi szabadenergiájának ( $\gamma_s$ ) diszperziós ( $\gamma_s^d$ ) és poláris részét ( $\gamma_s^p$ ). Összegükből pedig kifejeztük a felületi szabadenergiájukat ( $\gamma_s$ ). Ezekből az értékekből kiszámoltuk az anyagokra jellemző polaritást és az azonos anyagi minőséggel rendelkező szemcsék között értelmezhető kohéziós munkát ( $W_c$ ). A **III. táblázat** alapján elmondható, hogy a legnagyobb polaritási értékeket a kristályos Cip-HCl-szítált hatóanyag esetén kaptuk. A magnézium-sztearáttal turbulázott hordozó vonatkozásában pedig csökkent a minta polaritása. A kohéziós munkák ( $W_c$ ) eredményeinek ismeretében kijelenthető, hogy Cip-HCl-spd esetén ezen érték nagyságrendileg meg-  
egyezik a kiindulási kristályos formáéval, valame-

lyest csökkent értéket kaptunk. Magnézium-sztearát esetén kapott alacsony polaritási érték alátámasztja, hogy magas páratartalom esetén tényleg javíthatja a DPI készítmény nedvességgel szembeni ellenállását, ezáltal stabilitását is.

A 4. pontban leírtak alapján meghatároztuk a turbulázott termékek esetén fellépő adhézios munkát és erőt, illetve a rájuk jellemző szétterülési együtthatót (**IV. táblázat**). Azt látjuk, hogy a porlasztva szárított farmakont (Cip-HCl-spd) tartalmazó termékeknel jelentkező adhézios erő számottevően kisebb, megközelítőleg harmada, mint a szemcseméret optimalizálás céljából szitált, kristályos ciprofloxacín-hidrokloridot (Cip-HCl-szítált) tartalmazó minták esetén. Megállapítható, hogy a magnézium-sztearát (MgSt) csökkentette az adhézios munkát és erőt (antiadhézív segédanyag). Továbbá a negatív számértékből adódóan a hatóanyag

szétterülését a hordozó felületén kedvezőtlenebbé teszi, amelyet a Cip-HCl-spd+ (IH70+MgSt) elektromikroszkópos felvétele is alátámasztott már.

Az eddig ismertett adatok alapján az alábbi következtetések vonhatóak le:

- Abban az esetben, ha a hatóanyag összetapadásra is hajlamos, tehát jelentős kohéziós munka jellemzi, de az adhézios értékei hordozóval vizsgálva viszonylag alacsonyak, javasolt lehet ilyen sajátságú farmakon (pl. Cip-HCl-spd) esetén hordozó alkalmazása az inhalációs terápiában. Úgy véljük ilyen esetben a hordozó segíti, hogy a hatóanyag ne tapadjon össze, de az alacsony adhézios paraméterek miatt inhaláció során könnyen leszakad a farmakon a hordozó felületéről.
- Viszont ezzel ellentétben, ha az adhézio erős a hatóanyag-hordozó interaktív fizikai keverékében, akkor a hordozóra rátapad erősen a hatóanyag, így alapvetően nem segíthet hordozó alkalmazása magas kohezív sajátságok esetén sem (Cip-HCl-szítált).

III. táblázat

Nedvesedési peremszög desztillált víz és dijudmetán esetén, felületi szabadenergia és komponensei, illetve polaritás és kohéziós munka

Minták	$\Theta_{\text{viz}} [^\circ]$	$\Theta_{\text{dijódmétán}} [^\circ]$	$(\gamma_s^d) [mN/m]$	$(\gamma_s^p) [mN/m]$	$(\gamma_s) [mN/m]$	Polaritás [%]	Wc [mN/m]
Cip-HCl-szítált	10,70	14,40	44,37	36,43	80,80	45,09	161,6
Cip-HCl-spd	54,20	29,00	40,44	20,09	60,53	33,19	121,06
IH70	3,30	6,00	45,58	36,88	82,46	44,72	164,92
IH70+MgSt	64,60	62,00	26,07	19,22	45,29	42,44	-
MgSt	102,63	68,64	24,33	2,64	26,96	9,79	53,92

IV. táblázat

Turbulázott termékeinkben fellépő adhéziós munka és adhéziós erő, valamint a szétterülési együttható

Termékek	$W_a [mN/m]$	$F_{\text{adh}} [mN]$	$S_{21}$
Cip-HCl-szítált+IH70	108,26	$1,690 \cdot 10^{-3}$	1,64
Cip-HCl-szítált+(IH70+MgSt)	78,27	$1,216 \cdot 10^{-3}$	-45,59
Cip-HCl-spd+IH70	98,72	$0,596 \cdot 10^{-3}$	16,67
Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt)	73,23	$0,440 \cdot 10^{-3}$	-18,36

- Magnézium-sztearátot tartalmazó minta esetén csökkent a polaritás, az adhéziós munka és az adhéziós erő is, a szétterülés kedvezőtlenebbé vált. Ebből arra következtetünk, hogy az interpartikuláris kölcsönhatások módosultak, a hatóanyag könnyebben leválhat a hordozó felszínéről inhaláció során és javul a nedvességgel szembeni ellenállása a készítménynek.

Ezek alapján az *in vitro* tüdődepozíció során az alábbiakat várjuk:

- A porlasztva szárított hatóanyag (Cip-HCl-spd) esetében a jelentős kohéziós munka mellett alacsony adhéziós tulajdonság figyelhető meg, így hordozó alkalmazása javíthatja a tüdődepozíciót.
- A szemcseméret optimalizálás céljából szítált, kristályos ciprofloxacin-hidrokloridot (Cip-HCl-szítált) a porlasztott hatóanyaghoz (Cip-HCl-spd) képest magasabb kohéziós tulajdonság jellemzi, sőt az adhéziós értékei is jóval magasabbak, (ezáltal a hatóanyag szemcsék összetapadása is jelentős, viszont a hordozó és a hatóanyag között szintén erős a kölcsönhatás), így a hordozó alkalmazása nem segítheti elő a tüdődepozíciós eredmények javulását.
- Magnézium-sztearát igénybe vétele a formulálás során pedig várhatóan további tüdődepozíciós javulást eredményez.

#### *In vitro* aerodinamikai vizsgálat

Az Andersen-féle kaszkádimpaktor segítségével tanulmányoztuk a minták aerodinamikai viselkedését a következő paraméterek (FPF, fine particle fraction és MMAD, mass median aerodynamic diameter) meghatározásával. A tálcákon kitapadt hatóanyag mennyiségének ismeretében (UV-VIS spektroszkópia) Kaleida Graph kiértékelő program alkalmazásával számítottuk ki a paramétereket. A finom részecske frakció (FPF) a kaszkádimpaktor 2-5. szintjein kitapadt (1,1-5,7  $\mu\text{m}$ -es) szemcsék százalékos összetételét fejezi ki, ez a szemcseméret tartomány az ideális tüdődepozíció vonatkozásában. Az MMAD a részecskék valós-, belégzés során kialakuló átlagos aerodinamikai átmérője. Az emittált dózis (ED) az inhaláció során a kapszulából felszabaduló hatóanyag mennyige, százalékban kifejezve. Ezt úgy határoztuk meg, hogy a minták kapszulába bemérésekor feljegyeztük a kapszulák üres és töltött tömegét, majd az Andersen-féle kaszkádimpaktoros kísérletet elvégezve a kapszulákat visszamértük. A kiszámolt eredményeket az alábbi táblázatban tüntettük fel:

Az aerodinamikai vizsgálatok eredményei alapján (V. táblázat) a következő megállapításokat fogalmaztuk meg:

- A tüdődepozíció (FPF) vonatkozásában Cip-HCl-spd esetén hordozó alkalmazásával javulást értünk el. Ez-

V. táblázat

FPF, MMAD és ED értékek

Vizsgált minták	FPF (%)	MMAD ( $\mu\text{m}$ )	ED (%)
Cip-HCl-szítált	32,19	6,93	99,38
Cip-HCl-szítált+IH70	33,00	5,66	99,99
Cip-HCl-szítált+(IH70+MgSt)	32,87	4,91	99,75
Cip-HCl-spd	58,96	3,47	97,39
Cip-HCl-spd+IH70	62,42	3,23	99,87
Cip-HCl-spd+(IH70+MgSt)	74,40	2,45	99,41



zel ellentétben a Cip-HCl-szítált esetén a hordozó jelenléte nem eredményezett előrelépést. Cip-HCl-spd esetén a magnézium-sztearátot tartalmazó mintánál további jelentős FPF érték javulás látható.

- Az átlagos aerodinamikai átmérő (MMAD) vonatkozásában leszögezhető, hogy fordított arányosság figyelhető meg a szemcsék mérete és a depozíció hatékonysága között.
- Az emittált dózis (ED) tekintetében látjuk, hogy a hordozó alapú rendszerek esetében inhaláció során kevesebb hatóanyag maradt a kapszulában.
- A fizikai-kémiai vizsgálatok alapján tett következtetések és általuk a tüdődepozíció során várt tendenciák, eredmények beigazolódtak az Andersen-féle kaszkád-impaktor mérési eredményei alapján.

## 6. Összefoglalás, jövőkép

Célkitűzéseinknek megfelelően hordozó alapú DPI formulációkat állítottunk elő és vizsgáltunk irodalmi adatok és a kutatócsoport eddigi tapasztalatai alapján adott előállítási paraméterek alkalmazásával. Különbséget tapasztaltunk a hatóanyag szemcsék méretében és morfológiájában szítált, mikronizált és porlasztva szárított farmakon vonatkozásában. Magnézium-sztearáttal felületkezelést végeztünk, amely befolyásolta a hatóanyag hordozón való eloszlását, ezáltal az interpartikuláris kölcsönhatásokat és javította a tüdődepozíciós eredményeket is. Innovatív technológiának köszönhetően – azaz porlasztva szárított hatóanyag alkalmazása hordozó felületén – sikerült figyelemre méltó tüdődepozíciós eredményt (~FPF 75 %) elérnünk, amely messze túlszárnyalja a gyári készítményekét (~FPF 20-30 %) és felveheti a versenyt az új generációs DPI készítményekkel. Sőt interpartikuláris kölcsönhatások vizsgálata révén összefüggést találtunk az interaktív fizikai keverékek fizikai-kémiai tulajdonságai és tüdődepozíciós eredményei között. Tervezzük a szemléltetésre került készítmények stabilitási és *in silico* tudómodellezési vizsgálatait.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-16-2-I. kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült. A munka a Bolyai János kutatói ösztöndíj (2014-2017) támogatásával valósult meg.

## IRODALOM

1. Benke, E., Szabóné Révész, P., Ambrus, R.: Acta Pharm Hung. 87, (2017).

2. Healy, A. M., Amaro, M. I., Paluch, K. J., Tajber, L.: Adv Drug Deliver Rev, 75, 32–52 (2014).
3. Benke, E., Chvatal, A., Szabó-Révész, P., Ambrus, R.: Formulation of lactose-based dry powder inhalers by surface treatment containing different habit of active agent. 2<sup>nd</sup> European Conference on Pharmaceutics (2017).
4. Keyhaneh, K., Pallagi, E., Szabó-Révész, P., Csóka, I., Ambrus, R.: Drug Design, Development and Therapy, 10, 3331–3343 (2016).
5. Stass, H., Baumann-Noss, S., Delesen, H., Nagelschmitz, J., Willmann, S., Edginton, A.: Ciprofloxacin PulmoSphere® Inhalational Powder: a healthy volunteer study. American Thoracic Society International Conference (2008).
6. Pilcer, G., Wauthoz, N., Amighi, K.: Adv Drug Deliver Rev, 64(3), 233–256 (2012).
7. <https://www.meggle-pharma.com/en/lactose/20-inhalac-70.html> [2017.05.06.]
8. Palistra, M.: The influence of Magnesium Stearate and carrier surface on the deposition performance of carrier based Dry Powder Inhaler formulations. (2008).
9. Islam, N., Rashid, A., Camm, G.: Effects of magnesium stearate on the efficient dispersion of salbutamol sulphate from carrier-based dry powder inhaler formulations. Respiratory Drug Delivery (RDD) EUROPE, (2011).
10. da Silva Andrade, F. R.: Self-assembled polymeric micelles as powders for pulmonary administration of insulin. (2015).
11. <https://www.pharminindex-online.hu/gyogyszerkereso> [2017.05.06.]
12. <https://www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/> [2017.05.06.]
13. Chvatal, A., Benke, E., Szabóné Révész, P., Ambrus, R.: Gyógyszerészet, 60, 197–206 (2016).
14. [https://www.researchgate.net/publication/284045495\\_Insulin\\_spray-dried\\_powder\\_and\\_smoothed\\_lactose\\_a\\_new\\_formulation\\_strategy\\_for\\_nasal\\_and\\_pulmonary\\_delivery](https://www.researchgate.net/publication/284045495_Insulin_spray-dried_powder_and_smoothed_lactose_a_new_formulation_strategy_for_nasal_and_pulmonary_delivery) [2017.05.06.]
15. U.S. Pat. 2012/0082727 A1 (2012).
16. Hazare, S., Menon, M.: Indian J Pharm Sci, 725–727 (2009).
17. Palistra, M.: The influence of Magnesium Stearate and carrier surface on the deposition performance of carrier based Dry Powder Inhaler formulations. (2008).
18. Farkas B., Révész P.: Kristályosítástól a tablettázásig. UNIVERSITAS SZEGED KIADÓ, Szeged, 2007.
19. Schuster, J. M., Schvezov, C. E., Rosenberger, M. R.: Procedia Materials Science, 8, 732–741 (2015).
20. Tüske, Zs.: Influence of the surface free energy on the parameters of pellets. (2005).
21. Pomázi, A., Chvatal, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: Gyógyszerészet, 58, 131–139 (2014).
22. Wong, W., Crapper, J., Chan, H.-K., Traini, D., Young, P. M.: J Pharm Biomed Anal, 51(4), 853–857 (2010).
23. <https://vimeo.com/178587849> [2017.05.06.]
24. <http://www.capsugel.com/ihc/dry-powder-inhaler-capsules> [2017.05.06.]
25. Boarder, M., Newby, D., Navty, P.: 'Pharmacology for Pharmacy and the Health Sciences: a patient-centred approach', Oxford University Press, 1st ed., p273., (2010).
26. Pomázi, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: Acta Pharm Hung, 84, 55–62 (2014).
27. <https://www.scbt.com/scbt/product/ciprofloxacin-hcl-93107-08-5> [2017.05.06.]



## Hordozó alapú száraz porinhalációs rendszerek jellemzése és fejlesztési lehetőségei

BENKE EDIT<sup>1</sup>, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA<sup>1</sup>, HOPP BÉLA<sup>2</sup>, AMBRUS RITA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet, Szeged Eötvös utca 6. H-6720

<sup>2</sup>Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Fizikai Intézet, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék, Szeged, Dóm tér 9. H-6720

\*e-mail: arita@pharm.u-szeged.hu

### Summary

E. BENKE, P. SZABÓ-RÉVÉSZ, R. AMBRUS.: **Characterization and development of carrier-based dry powder inhaler systems**

**Introduction:** Today a number of possible options in relation to the formulation of a dry powder inhaler systems (DPIs) are published. Beside to the development of carrier-free (new generation) DPI formulations, the improvement of the traditional carrier-based DPI systems could be another focus of research. In these cases the type, size, shape and surface properties of carrier could be affected the lung deposition results.

**Aim:** Our aims were to describe the specific factors in the cases of carrier-based DPI systems affecting the lung deposition; to introduce the possibilities for surface modification and investigation methods for the characterization of the surface properties.

**Method:** In case of carrier-based formulation, the surface modification of the carriers is currently the largest development trend, namely by recrystallization of the carriers and their surface dissolution, fluidized-bed coating and by mechanical dry coating creating. Investigation of the surface properties of the carriers could be by a variety of methods to present a wide-ranging information obtained from the carrier-based DPI systems, thereby facilitating the development of these formulations.

**Results:** Many possibilities of surface modification of carriers and their lung deposition greatly improving effectiveness has been confirmed in many international publications. To achieve these results, the development testing methods of the surface properties of carrier to contribute.

**Conclusion:** During the development of interactive physical mixtures, optimization of parameters and understanding of an interparticulate interactions or rather applying this knowledge could help by the further improvement in pulmonary deposition.

**Keywords:** DPI, carrier-based formulation, interparticulate interactions, surface modification of carriers

### Összefoglalás

**Bevezetés:** Napjainkban a száraz porinhalációs rendszerek (DPI, dry powder inhaler) formulálásával kapcsolatban számos megoldási lehetőséget közöltek. A hordozómentes (új generációs) DPI formulációk folyamatos fejlesztése mellett a klasszikus, hordozó alapú DPI rendszerek korszerűsítése is újból a kutatások középpontjába került. Az utóbbi rendszerek esetében a hordozó típusa, mérete, alakja, illetve felületi sajátosságai mind hatással vannak a tüdődepozíciós eredményekre.

**Célkitűzés:** Munkánk célja részletesen ismertetni a hordozó alapú DPI rendszerek esetében a tüdődepozíciót befolyásoló sajátosságokat, tényezőket; a pulmonáris depozíciós eredményekre kedvező hatást gyakorló felületmódosítási lehetőségeket, illetve a felületek tulajdonságainak jellemzésére szolgáló vizsgálmódszereket.

**Módszerek:** A hordozó alapú formulálás esetén a hordozók felületének módosítása jelenti pillanatnyilag a legnagyobb fejlesztési irányvonalat, amelynek megvalósítása különféle módokon történhet, nevezetesen a hordozók átkristályosításával, felületük oldásával, fluidizációs bevonással és mechanikus száraz bevonat létrehozásával. A hordozók felületi sajátosságainak vizsgálata többféle módszerrel kivitelezhető, amelyek együttes alkalmazásával széleskörű információ nyerhető a hordozó alapú DPI rendszerekről, ezáltal elősegítik e formulációk fejlesztését.

**Eredmények:** A hordozók felületének számos módosítási lehetőségét és azok tüdődepozíciót javító eredményességét már sok nemzetközi közlemény alátámasztotta. Ezen eredmények eléréséhez a hordozók felületi sajátosságait vizsgáló módszerek fejlődése is hozzájárul.

**Következtetések:** Az interaktív fizikai keverékek tervezése során alkalmazott paraméterek optimalizálása és az interpartikuláris kölcsönhatások megismerése, illetve ezen ismeretek alkalmazása a preformulálás folyamán további pulmonáris depozíció javulást vetítenek előre.

**Kulcsszavak:** száraz porinhalációs rendszerek, hordozó alapú formulálás, interpartikuláris kölcsönhatások, hordozók felületmódosítása

## 1. Bevezetés

A DPI rendszerek formulálásuk függvényében lehetnek hagyományos hordozó alapú, illetve hordozómentes (új generációs) rendszerek. A forgalomban elérhető DPI-ok legnagyobb hányada klasszikus, hordozó alapú formulálással készül, amely során nagyméretű hordozó szemcse felületére viszik fel a hatóanyag részecskéket interaktív fizikai keverék kialakításával [1]. A hordozók alkalmazása előnyt jelent azon hatóanyagoknál, amelyek erős kohezív tulajdonsággal rendelkeznek [2], javítja a készítmény folyási sajátságait, a kis mennyiségű hatóanyag dozírozhatósága pontosítható, továbbá a hordozó íze megerősíti a betegben a sikeres inhaláció tényét [3]. Azonban a gyári készítmények többsége még nem rendelkezik kiemelkedő tüdődepozíciós értékkel. E készítmények átlagosan 20-30 %-os finom részecske frakciós (FPF, fine particle fraction) eredményekkel bírnak, ami azt jelenti, hogy a hatóanyag alacsony százalékban éri el a tüdő mélyebb rétegeit [4]. Az 1. ábra szemlélteti azt, hogy a hordozó alapú termékek esetén inhalálás során a készítmény nekiütközik az inhalátorba beépített rácsba, amely segíti a hatóanyag leszakadását a hordozóról. A gyári hordozó alapú készítmények alacsony FPF eredményei is azzal magyarázhatóak, hogy a hordozón maradt jelentős mennyiségű hatóanyag a felső légutakban kitapad, így nem jut el a tüdő kívánt szegmenseibe. Az 5. pontban ismertetésre kerülnek a hordozók felületmódosítási lehetőségeit, amelyek elősegítik a hatóanyag hordozóról történő leszakadását, így megoldást jelenthetnek az említett problémára.

Az új generációs száraz porinhalációs rendszerek esetén megfelelő segédanyagok és technológiai megoldások felhasználásával a nagyméretű hordozó szemcsék alkalmazása kiküszöbölhetővé vált. Ilyen új formulálási lehetőségek közé tartoz-

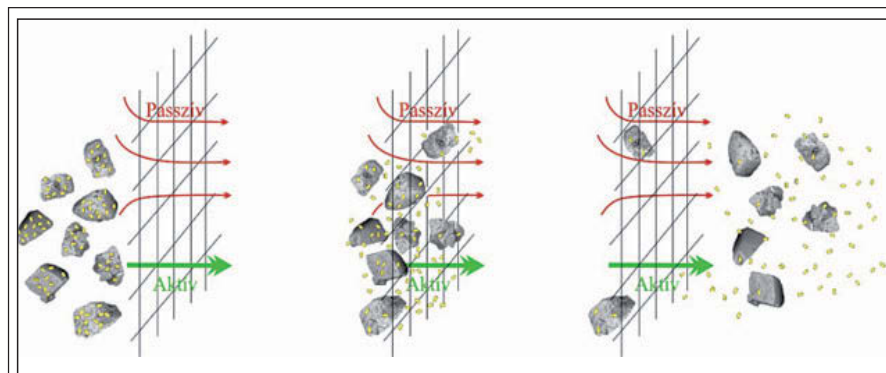
nak (2. ábra): a bevonószer felhasználásával készült, réteges felépítésű *bevonat részecskéik*; az akár fél milliméteres nagyságot elérő 1-5  $\mu\text{m}$ -es alkotórészek aggregációjának következtében kialakuló *szferoidok*; a kis sűrűségű és bemélyedt felszínnel rendelkező *PulmoSol® szemcsék*; a *Technosphere® technológia*, amely a diketopiperazin-fumarát molekulákból felépülő alapváz és az általuk bezárt hatóanyag molekulák rendszere. Továbbá az emulzióból előállított, üreges szerkezetű pórusos részecskéik (*LPP – large porous particles – és Pulmusphere®*), illetve a nanotartományú hatóanyag részecskéikből álló mikroméretű szemcsék létrehozása (*Trojan-részecskéik*) [1].

## 2. Hordozó típusa és habitusa

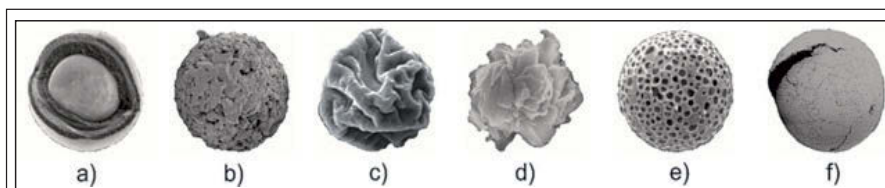
### 2.1 A hordozó típusa

A laktóz alapú DPI rendszereken túlmenően egykét kivételtől eltekintve – hazai és nemzetközi szinten sem érhető még el más, hordozó alapú forgalmazott készítmény. A laktóz alkalmazása során viszont formoterollal, peptidekkel, fehérjékkel is interakció alakul ki. A laktóz-intoleranciával rendelkező betegeknek pedig nem egységesek a nézőpontok laktóz alapú DPI készítmények alkalmazhatóságával kapcsolatban. Szükségszerűvé vált tehát új, nagyméretű hordozók használhatóságának vizsgálata DPI készítmények esetén. Az FDA (Food and Drug Administration) már engedélyezte glükóz-monohidrát és mannit esetében is a hordozóként való alkalmazást. A mannit hordozóként és különálló DPI rendszerként is alkalmazható. Forgalomban van pulmonális diagnosztikumként (Aridol™), illetve cisztás fibrózis és krónikus bronchitis (Bronchitol™) kezelésére. A trehalóz, eritrit, szorbit, szacharóz, raffinóz-pentahidrát, maltit, maltóz, xilit, dextróz, ciklodextrinek esetében pedig vizsgálatok folynak, hogy hordozóként alkalmazhatóak-e [5-7].

A virágpor hatékony tüdőbeli depozíciójából kiindulva már több közleményben beszámoltak a pollen alakú részecskéik pulmonális alkalmazási lehetőségéről. A szálas felületi morfológia jobb folyási sajátságot és jobb diszpergálhatóságot kölcsönöz a szemcséknek, illetve az interpartikuláris kölcsönhatások is



1. ábra: A hatóanyag hordozóról történő leszakadása inhaláció során



2. ábra: A hordozómentes formulálás morfológiai változatosságának szemléltetése: a) bevont részecske, b) szferoid, c) PulmoSol® szemcse, d) Technosphere® szerkezet, e) pórusos szemcse, f) Trojan-részecske [1]

csökkennek. Pollen formájú hidroxipatit-szemcsék száraz porinhalációs hordozóként való alkalmazhatóságának lehetőségét is tanulmányozták már. Budezoniddal hatóanyag-hordozó rendszert kialakítva nagyobb mértékű kötődést tapasztaltak, mint a korábbi laktóz alapú készítményeknél. Ezáltal feltételezhető, hogy ezen új típusú hordozó alkalmazásával javulnak az inhaláció hatékonyságát jellemző paraméterek (hatóanyag-kibocsátás és a belélegezhető frakció) [6, 8].

## 2.2. A hordozó mérete

A különböző tanulmányokat áttekintve az tapasztalható, hogy a hordozó szemcsék mérete vitás kérdést jelent. Egyes közlemények arról számolnak be, hogy a hordozók nagyságát csökkentve megnövelt belélegezhető frakció adódott, például szalbutamol-szulfát, terbutalin és más hatóanyagok esetén is. A hordozók csökkentett szemcseméretének (~50 µm) eredményeként turbulens áramlásban a nyíróhatás jelentősebb mértékű és a deaggregáció is eredményesebb. A kisebb méretű hordozók viszont a száraz porkészítmények folyási sajátságait kedvezőtlenül befolyásolhatják. Nagyméretű hordozók (~90 µm-nél nagyobb) alkalmazása esetén a tüdődepozíció mértéke nem törvényszerű, hogy csökkenjen [9].

## 2.3 A hordozó alakja

A hordozó szemcse és az alkalmazott hatóanyag között kialakuló kölcsönhatások egyértelműen összefüggésben állnak a hordozó morfológiájával. Az alak befolyását a diszperzításra viszont még nem sikerült teljes mértékben tisztázni. Szabálytalan formájú hordozók alkalmazása a legjellemzőbb. *In vitro* kísérletek bizonyítják, hogy hosszúság, túszerű, porózus és rán-

cos alakú hordozók használata száraz porinhaláció során javítja a tüdődepozíciót. A fentebb ismertetett pollen alakú hidroxipatit-hordozók esetében a hatóanyag diszpergálhatósága növekedett például budezonid tekintetében [6, 9-11].

## 2.4. A hordozó felületi sajátságai

Számtalan tanulmány bebizonyította, hogy a hordozók felszínének morfológiája hatást gyakorol az alkalmazott hatóanyag interpartikuláris adhéziójára. Az érdes hordozó felület nem kedvez a DPI rendszerek hatékonyságának, felületkezelés által pulmonális depozíció növekedést érhetünk el. Ezen módszereket az 5. pontban ismertetjük. Kiemelendő viszont, hogy a hatóanyag szemcséket a keverés alatt érő erőhatásoktól némileg megkíméli a felület folytonosságának időközönkénti megszakadása, illetve a hordozófelület egyenetlensége. Tehát a hordozó felszínének kialakítása során nehéz az egyensúly elérése, ami azt jelenti, hogy a kötőerők megfelelő nagyságúak legyenek a DPI készítmény előállíthatóságához és inhalációig a stabilitás biztosításához. Viszont olyan mértékűek se legyenek e kötőerők, hogy a hatóanyag részecskék a hordozón maradjanak az inhalálás során [9]. A szakirodalomban a nagyméretű hordozók felületének porozitását három csoportra osztják a pórusok átmérője szerint. Ezáltal megkülönböztetnek nanopórusos (pórusátmérő 1 µm alatti), mikropórusos (pórusátmérő 1-10 µm) és makropórusos (pórusátmérő 10 µm feletti) felületű hordozó-

	Nanopórusos felületű hordozó	Mikropórusos felületű hordozó	Makropórusos felületű hordozó
Sematikus ábra			
SEM = pásztázó elektronmikroszkóp			

3. ábra: A hordozó felszínének csoportosítása a pórusok átmérője szerint



kat (3. *ábra*). A nanopórusos hordozófelszín esetén a hatóanyag könnyen leszakad a hordozóról belégzés során, gyenge adhézió jellemzi a rendszert, ezáltal javulnak a tüdődepozíciós eredmények. Ezzel szemben a mikropórusos hordozófelszín erős kölcsönhatást idéz elő a hatóanyag és a hordozó között, gyenge aeroszol hatékonyságot eredményezve, mivel nagy felületen érintkezik a hordozó a mikronizált hatóanyaggal. A makropórusos hordozók felszíne gyakorlatilag simának is tekinthető. A hatóanyag-hordozó érintkezési felület mértékében a nanopórusos és mikropórusos érdekesség között helyezkedik el [12, 13].

### 3. Interaktív fizikai keverékek kialakításának paraméterei és eszközei

A laktóz vagy egyéb hordozó alapú DPI rendszereket gyakran nevezik interaktív fizikai keverékeknek. Ez azt jelenti, hogy a keveredés nem random, nem véletlenszerű, utalva ezzel a rendszerben fellépő interpartikuláris kölcsönhatásokra. A tipikus hatóanyag-hordozó tömegarány 1:67,5. Viszont széles skálán mozognak a keverési arányok, például Spinhaler® (Aventis) esetében 40 mg termék 20 mg nátrium-kromoglikát hatóanyagot és 20 mg laktóz hordozót tartalmaz, ebben az esetben 1:1 tömegarányú a keverés. Ezzel szemben a Diskus® (GlaxoSmithKline) és Diskhaler® (GlaxoSmithKline) vonatkozásában 1:250 a hatóanyag-hordozó tömegarány. Pulmonális terápiában tehát általában alacsony hatóanyag dózisokat alkalmaz-

nak, sokszor milligrammos mennyiségeket, sőt asztma kezelésében előfordulnak 20-500 µg-os dózisok is [5, 14-16].

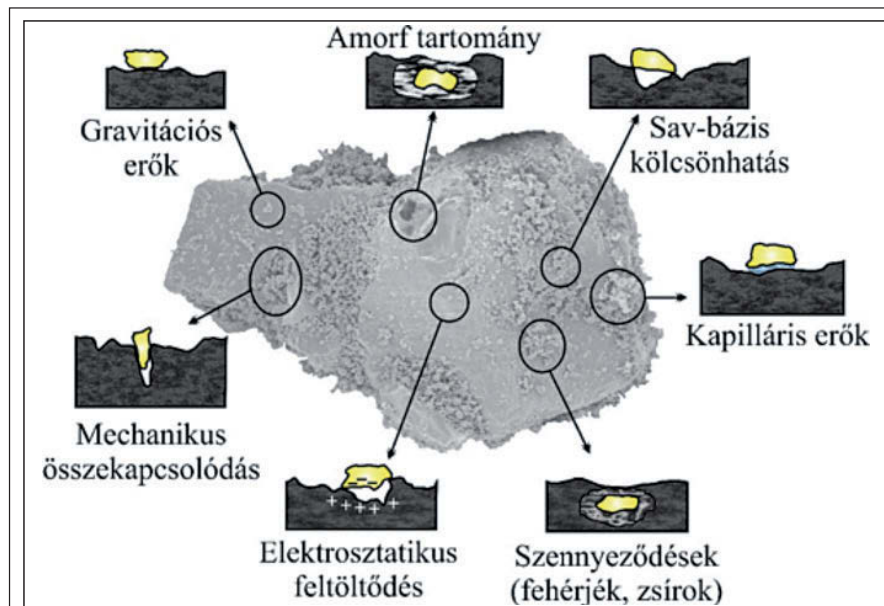
Így kijelenthető, hogy a keverési arány megválasztásánál figyelembe kell venni a hatóanyag dózisát és korlátozó tényezőként említendő az is, hogy mennyi tömegű por fér például az inhalátor kapszulájába. Az interaktív fizikai keverék előállítására általában Turbula-keverőt alkalmaznak [17], de előfordul, hogy erre a célra nagy nyíróerejű keverőt használnak [18]. A keverés idejének optimalizálása is kulcsfontosságú a készítmény formulálásának szemszögéből.

### 4. Interpartikuláris kölcsönhatások jellemzése hordozó alapú formulálás esetén

A hordozó és hatóanyag részecskék között fellépő adhézió, illetve a hatóanyag-hatóanyag szemcsék között kialakuló kohézió esetében is a fizikai erők a meghatározóak (4. *ábra*). Ezek lehetnek: van der Waals és/ vagy kapilláris erők, elektrosztatikus feltöltődés és mechanikus összekapcsolódás. A fizikai erők nagysága függ a hatóanyag szemcsék alakjától, méretétől, keménységétől és felszíni tulajdonságaitól; a hordozó részecskék vonatkozásában a felületi érdesség és az esetleges szennyeződések bírnak komoly jelentőséggel. Külön kiemelendő, hogy a relatív páratartalom és a száraz porinhalációs készítmények előállítása során alkalmazott keverés alatt fellépő préselő erők intenzitása és időtartama szintén számottevően befolyásolják a fentebb említett erők nagyságát. A sav-bázis kölcsönhatások és hidrogén-kötések révén a kémiai erők is figyelemre méltóak [5].

#### 4.1. Van der Waals erők és mechanikus összekapcsolódás / Mechanical interlocking/

A van der Waals erők dominálnak a mikroméretű szemcsékből álló száraz porinhalációs készítményekben. Az elektrodinamikus van der Waals erők alatt azt értik, amikor a molekulák különböző elektronikus konfigurációval rendelkeznek és a szom-



4. *ábra*: Hordozó alapú formulálás esetén fellépő interpartikuláris kölcsönhatások szemléltetése

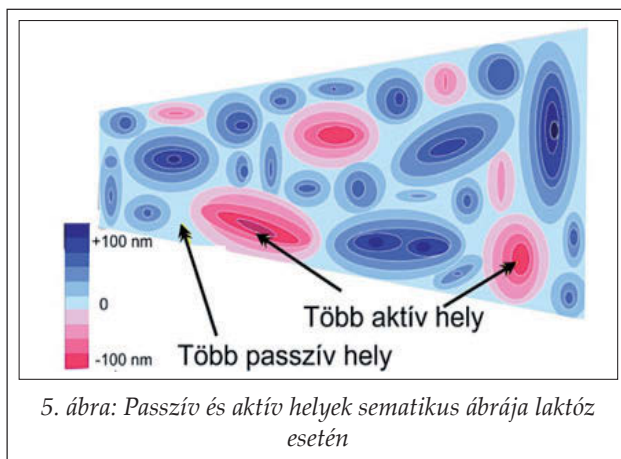
szédos dipoláris molekulák között általános vonzás alakul ki. A van der Waals erők között a gravitációs erők a legjelentősebbek, főként abban az esetben, ha a részecskeméret kisebb tíz mikrométernél és a szemcsék közötti távolság is száz nanométer alatt van. Hordozó alapú száraz porinhálációs készítmények esetén tehát a hordozó felületének érdekessége befolyásolja a van der Waals erők nagyságát, mivel változik a hordozó és a hatóanyag szemcse interpartikuláris távolsága. Egy mikrométeres nagyságrendű érdekesség esetén a van der Waals vonzás a nullához közelít. Amennyiben a hordozó felületén üregek találhatók, amelybe a hatóanyag szemcsék bele tudnak ékeledni, abban az esetben a két részecske érintkezési felülete megnő, és így jelentősen megnövekedik a van der Waals erők okozta vonzás, ezáltal úgynevezett mechanikus összekapcsolódás alakul ki [5].

#### 4.2. Kapilláris erők

A kapilláris erőket más néven „meniszkusz erőknek” nevezik. Folyadék híd alakul ki két részecske érintkezési felületénél, amennyiben ezek a felületek liofilek és elég közel vannak egymáshoz. Ez úgy jön létre, hogy a környező pára lecsapódik a korábban említett részen és folyékony konkáv alakú meniszkuszt eredményez. Magát a jelenséget „kapilláris kondenzációnak” nevezik. Mennyiségileg a Kelvin egyenlettel jellemezhető a folyamat. A kapilláris erők vonatkozásában a legnagyobb befolyásoló tényező mindenképp a környezet relatív páratartalma, de a hatóanyag és a hordozó részecskék fizikai-kémiai tulajdonságai (alak, méret, érdekesség és a felület kémiai jellemzői) ebben az esetben sem elhanyagolhatóak [5].

#### 4.3. Elektrosztatikus feltöltődés

A különböző felületek érintkezését követő elválaskor az ellentétes töltésű felszínnek esetében töltés átadás történik a donor és az akceptor között. Ez eredményez elektrosztatikus feltöltődést. A triboelektrifikáció olyan töltési jelenség, amely rövid ütközés vagy intenzív súrlódás következtében alakul ki. Az egymással érintkező anyagok töltési kapcsolatainak három típusát különböztetik meg: fém-fém, fém-szigetelő és szigetelő-szigetelő. A gyógyszeriparban alkalmazott ható-, és segédanyagok többsége szigetelő tulajdonságú, jellemző rájuk a nagy fajlagos ellenállás és a rossz vezetőképesség. Ezek a szemcsék érintkezhetnek egymással vagy más szigetelő anyagokkal (műanyag inhalátor



5. ábra: Passzív és aktív helyek sematikus ábrája laktóz esetén

alkatrészek), illetve fém felülettel (például a keverő edénnyel). A triboelektrifikáció jelensége gyártási folyamatok során az adhezív és kohezív erők növekedéséhez vezet, a por gördülékenysége/ folyási sajátsága is romlik, összességében csökkent aeroszol teljesítményt eredményeznek. Mind az inhalátor és az alkalmazott kapszula anyaga, sőt a relatív páratartalom is hatással vannak az elektrosztatikus töltések nagyságára. A száraz porinhálációs termékek esetében, tehát a gyártási folyamatok, a tárolás és inhaláció során fellépő elektrosztatikus erők megértése és optimalizálása javíthatják a DPI készítmények hatékonyságát [5].

#### 4.4. Aktív-helyek

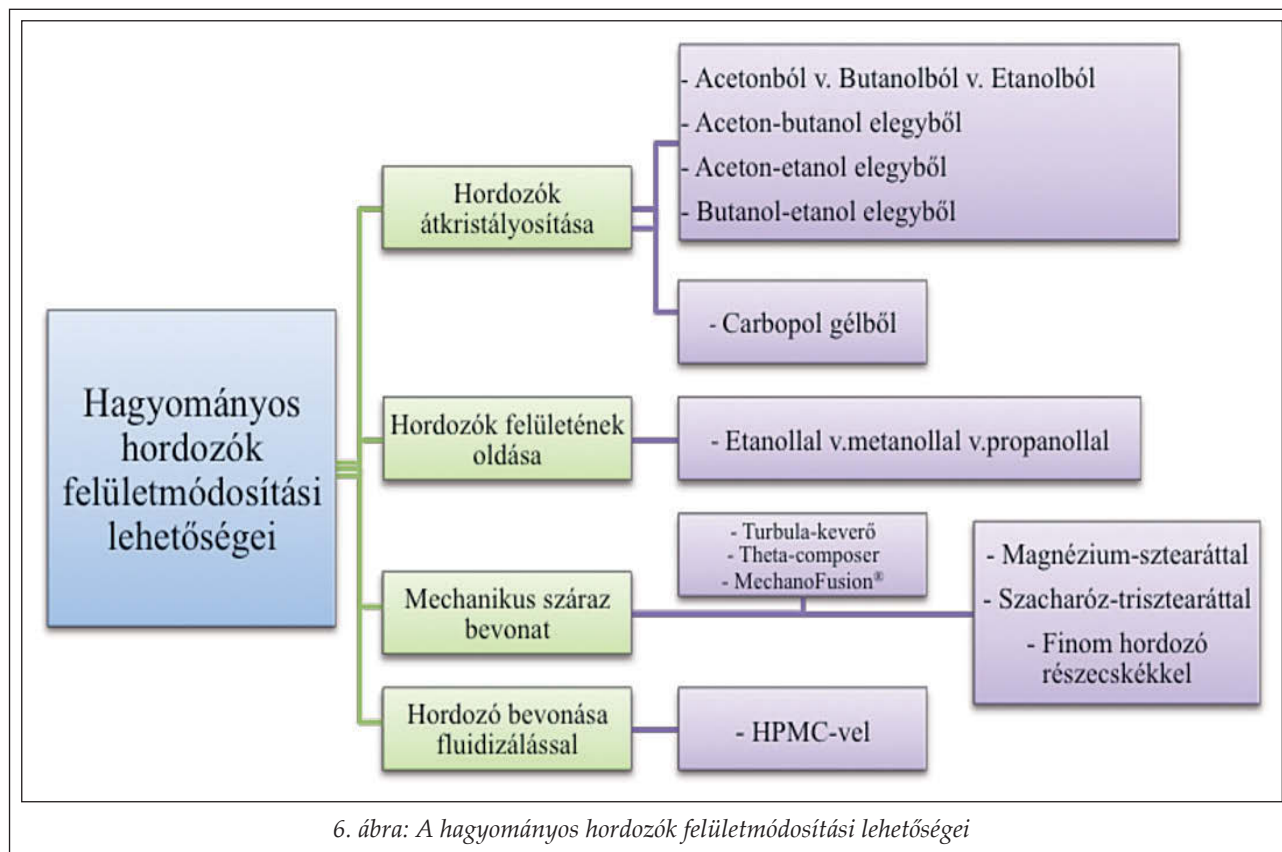
A hordozó molekulák (általában laktóz) felszínét heterogén energiaszintű és morfológia jellemzi. A fokozott energiájú területeket aktív helyeknek (5. ábra) nevezik. Ezek lehetnek morfológiai régiók (hullámvölgyek és csúcsok), amorf tartományok (örlés és porlasztva szárítás következtében), szennyeződések a laktóz felületén (például fehérjék és zsírok), valamint egyedi poláris/nem poláris régiók. Mind csökkent hatóanyag leválást eredményez a hordozó szemcséről történő inhaláció során [5].

### 5. Felületmódosítási lehetőségek

A hordozók felületének módosítására (emelkedett tüdődepozíciós eredmények elérése céljából) a szakirodalomban már számos lehetőséget ismertettek. Ezeket a 6. ábrán foglaltuk össze.

#### 5.1. Hordozók átkristályosítása

Több tanulmányban beszámoltak arról, hogy  $\alpha$ -laktóz-monohidráttal alkalmazva desztillált vízben túltelített oldatot készítettek 45-55 °C-on mele-



gítve, majd leszűrték és a szűrletet ezen a hőmérsékleten tartották. Ezt 5 ml/perc sebességgel anti-oldószerbe vagy anti-oldószer (kirázószer) elegybe csepegtetve kivált az  $\alpha$ -laktóz-monohidrát, majd szűrték és 24 órán keresztül 70 °C-on szárították. Ilyen átkristályosított hordozót tartalmazó minták esetében javult *in vitro* tüdődepozíciós értékeket (pl. FPF: 40,48±4,57%) tapasztaltak a felületkezeletlen hordozót tartalmazó mintához képest (FPF: 19,70±1,89%). Anti-oldószerként etanollal, butanollal, acetonnal kísérleteztek; illetve etanol-aceton, etanol-butanol, aceton-butanol elegyeket vizsgáltak különböző arányban. Carbopol gél felhasználásával, viszonylag bonyolult folyamat során is lehetséges a nagyméretű hordozók átkristályosítása a tüdődepozíciós eredmények javulása érdekében (~7%-os FPF érték emelkedés érhető el). [19-22].

## 5.2. Hordozók felületének oldása

Iida és mtsai szobahőmérsékleten  $\alpha$ -laktóz-monohidrátot (30 g) vizes etanolos (200 ml) oldathoz (70% V/V) adtak, kevertették 5, 10 vagy 20 percig, majd szűrték, a maradékot friss etanollal átmosták. A felületmódosított hordozót szilikagél exszikkátorban – amelyhez rotációs szivattyút is

csatlakoztattak- 6 órán át szobahőmérsékleten szárították. Szalbutamol-szulfát vonatkozásában a részletezett felületkezelet hordozót tartalmazó minták esetében jobb *in vitro* tüdődepozíciós értékeket kaptak, mint kezeletlen hordozót alkalmazva (FPF: 17,9±2,4%). A 10 percig kevertetett hordozót tartalmazó minta bizonyult a leghatékonyabbnak (26,7±1,0%) [23]. Kutatások alátámasztották a metanollal és a propanollal történő eredményes felületkezelést is [24].

## 5.3. Bevonás fluidizálással

Több tudományos munka is beszámolt már arról, hogy laktóz hordozót hidroxipropilmetilcellulóz (HPMC), desztillált víz és laktóz tartalmú bevonó folyadékkal 110, 180, illetve 240 percig Wurster fluidizációs bevonóberendezésben vontak be, majd szitálással elkülönítve a 40-88  $\mu$ m-es felületkezelet hordozó szemcséket használtak fel száraz porinhalációs minták előállításához. Az érdekesség és a fajlagos felület csökkent a bevonási idő növelésével. Szalbutamol-szulfát esetében az *in vitro* inhalációs tulajdonság javult (FPF: 34,9±3,7%) a kezeletlen hordozóhoz képest (FPF: 14,6±2,5%). Ideálisnak a 180 percen keresztül kezelt laktóz tűnik tüdődepozíciós eredmény tekintve [25].



#### 5.4. Mechanikus száraz bevonás

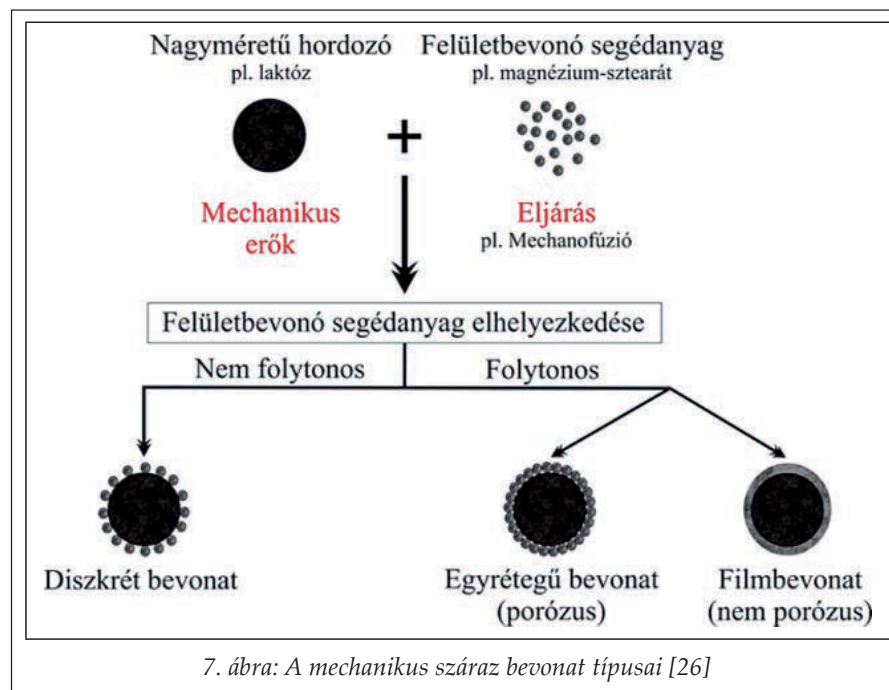
Az eddig ismertetett nedves felületmódosítási módszerek mellett lehetőség van mechanikus száraz bevonat kialakítására is a hordozó szemcse felületén. A bevonás során fellépő mechanikus erők következtében a bevonatot adó részecskék szorosan érintkeznek a nagyméretű hordozóval és kis méretűből kifolyólag a van der Waals kölcsönhatások elég erősek ahhoz, hogy a nagyméretű hordozó felületén maradjanak. A keletkező bevonat lehet diszkrét (nem folytonos), illetve folytonos a bevonási idő, a bevonó szemcsék tömegaránya, illetve a nagyméretű hordozó és a bevonó részecskék tulajdonságai függvényében. A folytonos bevonat esetén egyrétegű (porózus) és filmbevonat is kialakítható, amely legtöbbször nem porózus (7. ábra). A folytonos bevonat létrehozását általában jobban preferálják, viszont a diszkrét bevonat is előnyös lehet abban az esetben, ha a nagyméretű hordozó szemcse teljes árnyékolása nem kívánatos [26].

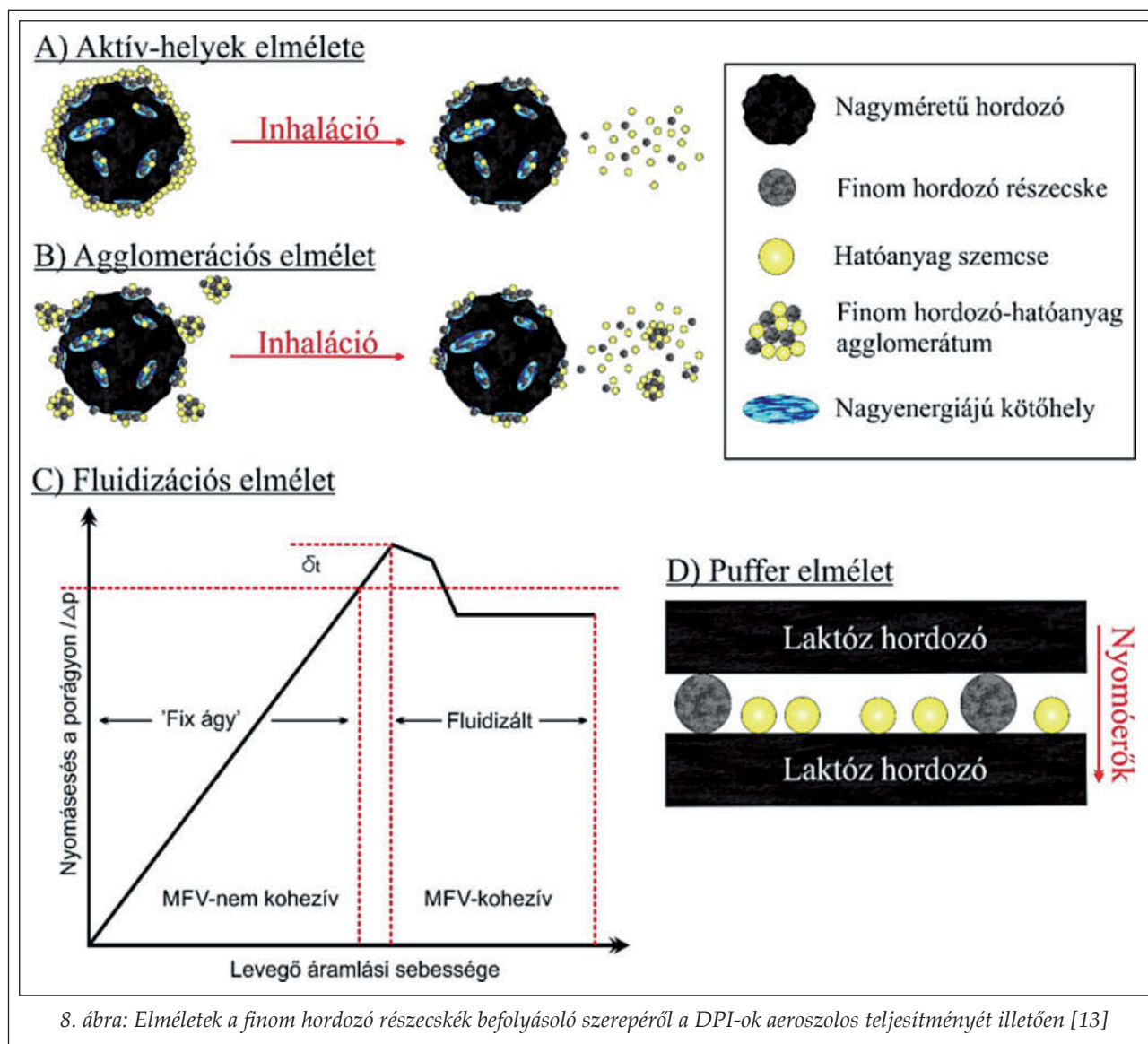
A mechanikus száraz bevonat létrehozása lehetséges Turbula-keverővel [27], illetve intenzív mechanikus száraz bevonó berendezésekkel, például a MechanoFusion®, a Hybridizer®, a Magnetically Assisted Impaction Coater (MAIC)® és a Theta-composer® készülékekkel. Ezen intenzív száraz bevonási folyamatok általános leírására a „mechanofúzió” kifejezést fogadták el. Példaképpen a Theta-composer® egy gyorsabb belső elliptikus forgórészből (500-3000 rpm) és egy lassúbb külső

elliptikus egységből (30 rpm) álló eszköz. Az említett két rész ellenkező irányba forog. Ilyen módszerrel vontak be 10 % szacharóz-trisztearáttal laktózt, amelynek a felülete ezáltal csökkent és simább lett, illetve javult inhalációs értékeket tapasztaltak, az *in vitro* tüdődepozíciós eredmény (FPF) 17,4%-ról 46,8%-ra emelkedett [28]. A magnézium-sztearát is alkalmas mechanikus száraz bevonat létrehozására, számos eredményes kísérlet bizonyítja kedvező hatását a tüdődepozíciós eredményekre [28-30].

Finom hordozó részecskékkel (*fine carrier particles*) is lehetséges a klasszikus, nagyméretű hordozók mechanikus száraz bevonása, amelyeket „másodlagos hordozóknak” is neveznek [31]. Ezen szemcsék mérete kisebb a klasszikus nagyméretű hordozókéhoz képest, azonban DPI rendszerek esetén az optimális átmérőjükről még nem született megállapodás, egyes tanulmányok hozzávetőleg 5-8 µm-es szemcseméretet tartják ideálisnak [32]. Alkalmazásuk, megfelelően kis koncentrációban, hozzájárul a DPI készítmények terápiás hatékonyságának növekedéséhez, amelyről már több értekezés beszámolt [13]. A SPIRIVA 18 mikrogramm inhalációs por kemény kapszulában készítmény (Boehringer Ingelheim International) mikronizált laktóz-monohidráttal tartalmaz [33], amely Magyarországon 2002 óta engedélyezett [34]. Egyes vizsgálatokban viszont jelenlétük DPI rendszerek estén FPF csökkenést okozott. Több hipotézis létezik arról, hogyan befolyásolják a DPI-ok aeroszolos teljesítményét (8. ábra) [13]:

– Az *aktív-helyek elméletét* Hersey vezette be, amelyet később széles körben alkalmaztak az említett rendszer működésének leírására. A hipotézis szerint amennyiben a nagyméretű hordozó felületén lévő -4.4. alpontban ismertetett- aktív helyeket finom hordozó részecskék elfoglalják, úgy a hatóanyag szemcsék gyengébb kötőhelyeken tapadnak meg a nagyméretű hordozó felületén, amely következtében javul a hatóanyag leválás a nagyméretű hordozó szemcséről inhaláció során. Azonban Grasmeijer és munkatársai rámutattak arra, hogy az aktív helyek konkrét definiálása még soha





- nem jött létre és az elmélet nem ad egyértelmű előrejelzést arra, hogy az aktív helyek mennyire befolyásolják egy inhalációs por teljesítményét. Így az aktív helyeket újonnan definiálták azon képességük alapján, hogy mennyire tartják meg a hatóanyag szemcséket a diszperzió során, amely a hordozó felületének és a készítmény fizikai tulajdonságaitól, illetve a diszperziós körülményektől függenek.
- Az *agglomerációs elmélet* szerint a finom hordozó részecskék alkalmazása során a hatóanyag szemcsékkel agglomerátumokat képeznek, amelyek nagyobb valószínűséggel válnak le a nagyméretű hordozó felszínéről inhaláció esetén az agglomerátumokra ható nagyobb légellenállási erő miatt.
  - A *fluidizációs elmélet* alapján fluidizáció egy DPI készítményben akkor jelentkezik, amikor a sta-

- tikus por áramlási nyomásesése egyenértékű a porhalmaz egységnyi alapterületére eső súlyával. Ezt a nyomás küszöbértéket nevezik fluidizációs kezdőpontnak vagy minimális fluidizációs sebességnek (MFV). Finom hordozó részecskék használata javítja a DPI teljesítményét a készítmény szakítószilárdságának növelésével, ami közvetlen összefüggésben áll az interpartikuláris erővel és a hordozó szabad térfogatával. Ezáltal az MFV jelentősen eltolódik, így növeli a légellenállási erőt, ami a porágy fluidizálódásához szükséges.
- A *puffer elmélet* alapján a nagyméretű hordozóhoz tapadó kisebb méretű finom hordozó részecskék, mint puffer működnek másik nagyméretű hordozóhoz való ütközés esetén. Védik a kisebb hatóanyag részecskéket az ütközés során fellépő nyomóerőktől, illetve az ütközés kö-

vetkeztében fennmaradó adhéziótól, így elősegítik a megnövekedett hatóanyag leválást a nagyméretű hordozóról inhaláció során.

- Az *eset-függő elmélet* arra világít rá, hogy a finom hordozó részecskék, amelyek szemcsemérete hozzávetőleg megegyezik a mikronizált hatóanyagéval, nem minden esetben javítják a DPI-ok esetében az aeroszol teljesítményt. Összehasonlítva kizárólagos alkalmazásukat DPI-ok esetén nagyméretű hordozókéval elmondható, hogy a nagyméretű hordozók esetén nagyobb hatóanyag leválás tapasztalható. Tehát a finom hordozó részecskék alkalmazása abban az esetben hoz kedvező eredményt, ha a DPI rendszerre vonatkoztatott alacsony százalékban és nagyméretű hordozó szemcsékkel együtt alkalmazzák őket.

Új megközelítést, további fejlesztést jelent finom hordozó részecskék vonatkozásában az átkristályosított kisméretű hordozók alkalmazása klasszikus, nagyméretű hordozó felületén. W. Kaialy és mtsa mannit esetében acetontól és etanolból is elvégezték az átkristályosítást, majd 20 µm-es szitán átszitálták az átkristályosított szemcséket, így finom hordozó részecskéket nyertek. Az acetontól átkristályosított kisméretű hordozó (ACM) szélesebb, rúd alakú, amíg az etanolból átkristályosított mannit (ECM) szemcsék tű formájúak lettek. Alkalmazásuk a száraz porinhalációs rendszerben meggyőző eredményt mutatott. Az FPF eredmények a következőképp alakultak abban az esetben, ha szalbutamol-szulfátot (SS) alkalmaztak hatóanyagként, α-laktóz-monohidrátot (L) pedig nagyméretű hordozóként: L-SS (14,9±1,2%), L-SS-kezeletlen mannit (20,1±5,3%), L-SS-ACM (28,8±0,3%), L-SS-ECM (32,6±1,1%). Ez azt jelenti, hogy a hatóanyag hozzávetőleg kétszerese éri el a tüdő mélyebb szegmenseit ECM alkalmazásával, ahhoz a rendszerhez képest, amelyben nem található kisméretű hordozó és jelentős az FPF javulás a kezeletlen mannit tartalmú DPI termékhez képest is. A tanulmány szerzői az *aktív-helyek elméletével* magyarázzák az aeroszolos teljesítmény javulását [32]. Feltételezhető a laktóz hordozó felületén lévő mikropórusok (1-10 µm) lefedése a tű alakú mannit kristályok révén [12].

## 6. A hordozók felületi sajátságainak, érdekességének vizsgálati módszerei

### 6.1. Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)

A DPI készítmények esetében a szemcsék morfoló-

giájának jellemzésére, méretük megállapítására széles körben alkalmazzák a SEM-et. Hordozó alapú rendszerek esetében a hatóanyag nagyméretű hordozó felületén való szétterülésének mértéke, eloszlottsága is jól detektálható, továbbá agglomerátumok képződésének kimutatására is alkalmazható módszer. A nagyméretű hordozó szemcsék morfológiája és mérete szintén tanulmányozható ezen eszközzel és ugyancsak információ szerezhető a hordozó felületének érdekességéről [35]. E módszerrel kétdimenziós kép készíthető a mintáról (3. ábra). Mérési tartománya széles skálán mozog: néhány négyzetmilliméteres felületről és milliméteres mélységekről is felvétel nyerhető [36].

### 6.2. Atomerő mikroszkóp (AFM)

Az AFM szintén egy hasznos vizsgálati eszköz DPI-ok esetében adhezív tulajdonságok tanulmányozására. Információt nyújt a szemcsék felületi reakcióképességről, a felületi energiáról és az interpartikuláris kölcsönhatásokról, ezáltal segítséget jelent a hordozó alapú rendszerek fejlesztése során [35]. Az AFM előnye a SEM-hez képest, hogy háromdimenziós képek nyerhetők a mintákról, illetve a termékek előkészítése nem szükséges. Mérési intervallumai szűkebbek a SEM-hez képest: a maximális vizsgálható felület 150 µm x 150 µm, illetve legfeljebb 10-20 µm-es mélyedések detektálhatók, viszont e tartományok megfelelőek DPI rendszerek vizsgálatára [36].

### 6.3. Inverz gázkromatográfia (IGC)

Az IGC alkalmazható a szemcsék felületi energiájának, illetve a DPI-ok adhezív tulajdonságainak jellemzésére. Ebben a módszerben inert poláros és nem poláros gázokat eluálnak állandó áramlással szilárd analittal töltött oszlopokon keresztül. A gáz próbamolekulák közötti kölcsönhatások és az állófázis határozza meg a retenciók térfogatot. A részecskék nem igényelnek semmilyen előkezelést [35].

## 7. Összefoglalás

A hordozó alapú száraz porinhalációs rendszerek jelenleg is a forgalomban levő DPI-ok legnagyobb hányadát teszik ki. Ezáltal az új generációs (hordozómentes) rendszerek mellett ezen formulációk továbbfejlesztése is a kutatások fókuszában áll. Közleményünkben összefoglalásra kerültek azok a tényezők, úgymint a hordozó típusa és habitusa, az interaktív fizikai keverékek kialakítási paraméterei



és eszközei, illetve az interpartikuláris kölcsönhatások, amelyek befolyásoló szereppel bírnak a rendszerek tüdődepozíciós eredményeire. Az utóbbi időben számos nemzetközi közlemény jelent meg a hordozók felületmódosítási lehetőségeiről, amelyek segítségével a tüdődepozíciós eredmények javíthatók, ezáltal megoldási lehetőségeket nyújtva a hordozó alapú DPI-ok fejlesztésére. Kutatócsoportunk a nemzetközi irányvonalaknak megfelelően hagyományos, hordozó alapú és új generációs DPI-ok fejlesztésével is foglalkozik.

### 8. Köszönetnyilvánítás

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-16-2-I. kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült. This research was supported by the GINOP-2.3.2-15-2016-00036 ("Development and application of multimodal optical nanoscopy methods in life and material sciences") project.

### IRODALOM

- Chvatal, A., Benke, E., Szabóné Révész, P., Ambrus, R.: *Gyógyszerészet*, 60, 197-206 (2016).
- Benke, E., Chvatal, A., Szabó-Révész, P., Ambrus, R.: Formulation of lactose-based dry powder inhalers by surface treatment containing different habit of active agent. 2<sup>nd</sup> European Conference on Pharmaceutics (2017).
- Chvatal, A., Szabó, B., Szabóné Révész, P., Ambrus, R.: *Acta Pharm Hung*, 86(043), 75-83 (2016).
- Demoly, P., Hagedoorn, P., de Boer, A. H., Frijlink, H. W.: *Resp Med*, 108(8), 1195-1203 (2014).
- Pilcer, G., Wauthoz, N., Amighi, K.: *Adv Drug Deliv Rev*, 64(3), 233-256 (2012).
- Rahimpour, Y., Kouhsoltani, M., Hamishehkar, H.: *Drug Discov Today*, 19(5), 618-626 (2014).
- Labiris, N. R., Dolovich, M. B.: *Br J Clin Pharmacol*, 56(6), 600-612 (2003).
- Hassan, M. S., Lau, R.: *Curr Pharm Design*, 16(21), 2377-2387 (2010).
- Hamishehkar, H., Rahimpour, Y., Javadzadeh, Y.: The role of carrier in dry powder inhaler. Recent Advances in Novel Drug Carrier System, InTech Open Access Publisher, pp. 39-66 (2012).
- Mullins, M. E., Michaels, L. P., Menon, V., Locke, B., Ranade, M. B.: *Aerosol Science and Technology*, 17(2), 105-118 (1992).
- Crowder, T. M., Rosati, J. A., Schroeter, J. D., Hickey, A. J., Martonen, T. B.: *Pharm Res*, 19(3), 239-245 (2002).
- O. Shalash, A.: *Drug Delivery to the Lungs* 27, (2016).
- Peng, T., Lin, S., Niu, B., Wang, X., Huang, Y., Zhang, X., Li, G., Pan, X., Wu, C.: *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 308-318 (2016).
- Newman, S. P., Busse, W. W.: *Resp Med*, 96, 293-304, (2002).
- U.S. Pat. 7,344,734 B2 (2008).
- Larhrib, H., Zeng, X. M., G. P. Martin, G. P., Marriott, C., Pritchard, J.: *Int J Pharm*, 191(1), 1-14 (1999).
- Le, V. N. P., Thi, T. H. H., Robins, E., Flament, M. P.: *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 13(2), 477-484 (2012).
- <https://aiche.confex.com/aiche/2016/webprogram/Paper464728.html> [2017.március 29.]
- Kaialy, W., Martin, G. P., Ticehurst, M. D., Royall, P., Mohammad, M. A., Murphy, J., Nokhodchi, A.: *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 13(1), 30-43 (2011).
- Kaialy, W., Ticehurst, M. D., Murphy, J., Nokhodchi, A.: *J Pharm Sci*, 100(7), 2665-2684 (2011).
- Nokhodchi, A., Kaialy, W.: *Dry powder inhalers: influence of lactose physicochemical properties on aerosol performance*.
- Zeng, X. M., Martin, G. P., Marriott, C., Pritchard, J.: *Eur J Pharm Biopharm*, 51, 55-62 (2001).
- Iida, K., Hayakawa, Y., Okamoto, H., Danjo, K., Leuenberger, H.: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51(1), 1-5 (2003).
- Shadbad, M. R. S., Millen, L., Momin, MN., Nokhodchi, A.: *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(7), 873-881 (2013).
- Iida, K., Todo, H., Okamoto, H., Danjo, K., Leuenberger, H.: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53(4), 431-434 (2005).
- Pfeffer, R., Dave, R. N., Wei, D., Ramalakhan M.: *Powder Technology* 117, 40-67 (2001).
- U.S. Pat. 2012/0082727 A1 (2012).
- Zhou, Q., Morton, D. A. V.: *Adv Drug Deliv Rev*, 64(3), 275-284 (2012).
- Hazare, S., Menon, M.: *Ind J Pharm Sci*, 725-727 (2009).
- Islam, N., I., Rashid, A., Camm, G.: Effects of magnesium stearate on the efficient dispersion of salbutamol sulphate from carrier-based dry powder inhaler formulations. In: *Respiratory Drug Delivery (RDD) EUROPE*, 2011.
- Kinnunen, H., Hebbink, G., Peters, H., Shur, J., Price, R.: *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 15(4), 1009-1020 (2014).
- Kaialy, W., Nokhodchi, A.: *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 15(3), 728-743 (2013).
- <https://www.pharmindex-online.hu/gyogyszerkereso> [2017. március 29.]
- <https://www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/> [2017. március 29.]
- Nokhodchi, A., Martin, G. P.: *Pulmonary Drug Delivery: Advances and Challenges*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, United Kingdom, 1st ed., 2015. pp. 52.
- [http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2010-0012\\_polimerek\\_merestechnikaja/ch04.html#id576752](http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2010-0012_polimerek_merestechnikaja/ch04.html#id576752) [2017. március 29.]

# Folyamatos kristályosítási eljárás fejlesztése impinging jet módszerrel

TARI TÍMEA\*, AIGNER ZOLTÁN

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet, H-6720 Szeged, Eötvös u. 6.

\*Levelezési cím: tari.timea@pharm.u-szeged.hu

## Summary

TARI, T., AIGNER, Z.: *Development of continuous crystallization process using impinging jet method*

**Introduction:** Nowadays, in pharmaceutical industry, it is a great challenge to convert technologies from batch to continuous mode. Our aim was to develop a continuous antisolvent crystallization method using impinging jet nozzles in case of glycine as model material and optimize the crystallization parameters for high quality product.

**Methods:** Impinging jet mixer was applied in non-submerged mode in a double-walled crystallization reactor, and samples were separated from the crystallized product at given intervals during continuous crystallization. Properties of the samples were examined by several analytical methods (laser diffraction particle size analyser, light microscopic image analysis system, scanning electron microscope, differential scanning calorimetry, powder X-ray diffraction, etc.)

**Results:** Morphology, average particle size, particle size distribution, residual solvent and additive potassium quantity of the continuous crystallized products were not changed significantly compared to the batch process. The main polymorph was the  $\alpha$  form, during progression of crystallization, increasing of small amount of  $\beta$ -polymorphic form was observed. Percentage yield was improved compared to the batch crystallization method.

**Conclusion:** It was found, that the continuous impinging jet crystallization is suitable for producing of high quality, uniform product in large quantity. The method also proved to be reproducible.

**Keywords:** continuous crystallization, impinging jet, glycine, crystal habit, polymorphism

## Összefoglalás

**Bevezetés:** A gyógyszeriparban manapság nagy kihívást jelent a hagyományos szakaszos technológiák átalakítása folyamatos eljárásokká. Jelen munkánkban célunk volt egy folyamatos antizsolvens kristályosítási módszer fejlesztése impinging jet technikával, glicin modell anyag esetében, és a kristályosítási paraméterek optimalizálása magas minőségű termék előállítása céljából.

**Módszerek:** Az impinging jet egységet a dupla-falú kristályosító reaktoron kívül elhelyezve („non-submerged” mód) alkalmaztuk, és a folyamatos kristályosítás során a kristályosított termékből adott időközönként mintákat különítettünk el. A termékminták tulajdonságait számos analitikai módszerrel vizsgáltuk (lézer diffrakciós szemcseméret analízis, fénymikroszkópos képanalizálás, pásztázó elektronmikroszkóp, differenciális pásztázó kaloriméter, por-röntgen diffraktométer, stb.)

**Eredmények:** A folyamatos kristályosítással készült termék morfológiája, átlagos szemcsemérete, szemcseméret-eloszlása, maradékoldószer- és additív-tartalma nem változott a szakaszos előállítással készített termékhez képest. A kristályosított termék  $\alpha$ -polimorf volt, mellette a folyamat előrehaladása során a  $\beta$ -polimorf forma kismértékű növekedését detektáltuk. A kitermelési százalék javult a szakaszos módszerhez képest.

**Összegzés:** Megállapítottuk, hogy a folyamatos impinging jet kristályosítás alkalmas reprodukálható, egyenletes minőségű, nagy mennyiségű termék előállítására.

**Kulcsszavak:** folyamatos kristályosítás, impinging jet, glicin, kristály habitus, polimorfia

## 1. Bevezetés

A gyógyszeriparban manapság egyre inkább teret hódít a folyamatos technológiák kialakítása mind a kutatás-fejlesztés, mind a gyártás területén. A folyamatos eljárásnak számos előnye van a korábban alkalmazott szakaszos módszerekkel szemben, amelyek közül legmeghatározóbbak a költségek, az idő- és a helyigény jelentős csökkentése [1, 2]. A

folyamatos módszer egységesebb terméket eredményez, hiszen a gyártási tételek közötti minőségi különbségek kiküszöbölhetőek, jobb kitermelés érhető el, a minőségi ellenőrzés könnyebben megvalósítható, az automatizálásuk egyszerűbben kivitelezhető [3, 4].

A hagyományos kristályosítási eljárások fejlesztése laborméretű reaktorokban kezdődnek, és a jelentős méretnövelés során nem minden esetben

vihetők át egyszerűen az optimális paraméterek ipari méretekre. Nagyobb gyártási mennyiség eléréséhez nagy méretű reaktorok, drága készülékek szükségesek, melyeknek tisztítása időigényesebb, minden külön lépést validálni szükséges. A felsoroltak mindegyike a gyártásból kiesett időt jelentik. Folyamatos kristályosítás során elegendő egy kisméretű reaktor használata, hiszen a termék eltávolítása folyamatosan történik, használatuk gazdaságosabb [5-7]. Célszerű tehát a már létező és engedélyezett szakaszos eljárást átalakítani folyamatos módszerre, hiszen a megalkotott tervezési tér („design space”) elemeit követve biztosítható az állandó minőségű termék, és lehetőség nyílik a mai szigorú szabályozások mellett is a gyorsabb engedélyeztetési eljárásra [8]. A megfelelő kristályosítási módszer megválasztásával pénz és energia spórolható, hiszen ha már a hatóanyaggyártás során optimális tulajdonságokkal rendelkezik a termék, nincs szükség további utóműveletek elvégzésére (pl. szemcseméret csökkentés, frakcionalizálás, egyéb technológiai műveletek) [9, 10].

A kristályhabitus, mint a szemcseméret, -felület és -alak, nagymértékben befolyásolja a hatóanyagok gyógyszerformába történő feldolgozhatóságát [11]. A kis átlagos szemcseméret és a szűk szemcseméret-eloszlás gyakori követelmény a rossz vízoldékonyságú (Biopharmaceutics Classification System, BCS II. csoportba tartozó) hatóanyagok esetében. Ezek a paraméterek befolyásolhatják az oldódási sebességet, biohasznosíthatóságot, stabilitást, a tablettákban a hatóanyagok eloszlottságának egységességét [12, 13]. A megfelelő kerekdedségű és sima felszínű szemcsék agglomerációra kevésbé hajlamosak, így szűrhetőségük és porreológiai, folyási tulajdonságuk is kedvezőbbek. A szemcsék habitusa aditívek hozzáadásával is módosítható, hiszen az aditívek szelektíven gátolják vagy elősegítik az egyes kristályoldalak növekedését többféle mechanizmuson keresztül. Hatásuk függ többek között az anyagi minőségüktől és koncentrációjuktól, továbbá befolyásolhatják a hatóanyagok polimorfiját, ezzel oldékonyságukat, a készített tabletták szilárdságát, hatékonyságát [14-16].

Impinging jet (IJ, „összeütköző sugarak”) antiszolvens kristályosítás során a hatóanyagot tartalmazó telített oldat és az antiszolvens két külön, egymással szemben álló csövön keresztül áramlik nagy sebességgel. A kis térfogatú keverési térben az oldatok találkoznak, ahol nagy intenzitású mikrokeverés jön létre, homogén és nagy szuper-

szaturáció jelentkezik a nukleáció megindulása előtt, így elérhető a szűk szemcseméret-eloszlású, kis átlagos szemcseméretű termék előállítás. A szemcseméret-eloszlás és a kristály habitus befolyásolható a kristályosítási paraméterek változtatásával, mint például az áramlási sebesség, hőmérséklet vagy az utókeverési idő módosításával. A pillanatszerű, gyors kristályosítási folyamat következtében viszont a kristályok morfológiája nehezen befolyásolható [17-19].

A glicin a legegyszerűbb kémiai szerkezetű aminosav. Jellemzően gyors kristálynövekedéssel nagy méretű kristályokban kristályosodik, így különösen jól alkalmazható a habitus módosító és szemcseméret csökkentő eljárások hatékonyságának modellezésére. A glicinnek standard körülmények között három polimorf módosulata ismert:  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -forma. A módosulatok megjelenését befolyásolják a különböző kristályosítási paraméterek, mint pl. az oldószer és az antiszolvens minősége és aránya, a hőmérséklet, a különböző koncentrációjú aditívek jelenléte. Vizes közegből spontán nukleációval képződő fő polimorfja az  $\alpha$ -glicin. A kristályszerkezete monoklin (tércsoport:  $P2_1/n$ ) és normál körülmények között ez a forma metastabil. A  $\beta$ -glicin a legkevésbé stabil módosulat, bizonyos idő elteltével átalakul  $\alpha$ -polimorffá, kristályszerkezete szintén monoklin (tércsoport:  $P2_1$ ). Megjelenését elősegíti az etanol és metanol jelenléte vizes közegben. Termodinamikailag a  $\gamma$ -glicin a legstabilabb polimorf forma standard körülmények között, melynek kristályszerkezete trigonális (tércsoport:  $P3_1$ ). Azonban az  $\alpha$ -glicin gyakrabban fordul elő vizes közegben, és nem alakul át ezen körülmények között  $\gamma$ -formává [20-22].

Korábbi vizsgálatainkban glicin kristályosításánál alkalmaztuk az impinging jet módszert és szemcseméret csökkentő hatását összehasonlítottuk a konvencionális kristályosítási eljárásokkal szemben. Megállapítottuk, hogy a hűtéses, az antiszolvens, illetve a reverz antiszolvens módszerekhez képest is több mint egy nagyságrendnyi szemcseméret csökkentést eredményezett az új módszer, megfelelő szemcseméret-eloszlás és maradék oldószer-tartalom mellett [23]. Továbbá megfelelő koncentrációjú kálium-klorid aditív alkalmazásával elérhető a szemcsék kerekdedségének javítása, így közel szférikus szemcsék állíthatók elő alacsony maradék kálium-tartalom és stabil polimorf forma mellett [24].

Jelen munkánkban egy saját fejlesztésű impinging jet eszköz folyamatos kristályosítási eljárásban való alkalmazhatóságát vizsgáltuk nagy térfo-



gató oldatok felhasználásával, additív jelenlétében. Célunk volt, hogy a módszer biztosítson megfelelő kitermelést, reprodukálható, gyors és pontos legyen. A korábbi vizsgálataink alapján optimalizált kristályosítási paramétereket alkalmaztuk glicin modell anyag esetében, és összehasonlítottuk a termék fizikai-kémiai tulajdonságait a szokásos eljárás eredményeivel.

## 2. Anyagok és vizsgálati módszerek

### 2.1. Anyagok

Munkánk során a glicint, mint modell anyagot alkalmaztuk, melyet a VWR forgalmaz (Leuven, Belgium). Az antiszolvensként használt 96%-os etanol szintén a VWR terméke. Az additívként alkalmazott kálium-kloridot a Scharlau forgalmazza (Barcelona, Spanyolország). Oldószerként Ph. Hg. VIII. minőségű tisztított vizet használtunk.

### 2.2. Impinging jet kristályosítás

Az impinging jet egység külső elemként (non-submerged) volt alkalmazva a duplafalú, kerekített aljú Schmizo kristályosító reaktorral (Schmizo AG, Oftringen, Svájc), amelyben a folyamatos keverést egy IKA Eurostar digitális motorral meghajtott anker-típusú keverő biztosította 250 rpm fordulatszámmal (IKA-Werke GmbH & Co., Staufen, Németország). A folyadékok adagolását két azonos típusú kalibrált perisztaltikus pumpa végezte (Rollpump Type 5198, MTA Kutesz, Budapest, Magyarország). A 200 ppm KCl additívet tartalmazó telített glicin oldat és a 96%-os etanol állandó sebességgel (4,06 m/s) áramlott, 1:1 arányban az adott átmérőjű csöveken keresztül az impinging jet elem keverő terébe [24]. A kísérleteket állandó hőmérsékleten, 25 °C-on végeztük, amelyet Julabo F32 (Julabo GmbH, Seelbach, Németország) kriotermostáttal biztosítottunk, Julabo EasyTemp 2.3e software vezérlésével. A folyamatos kristályosítás során keletkezett szuszpenzió szűrése szűrőnucson folyamatosan történt, ennek során percenként különítettünk el a nedves kristály frak-

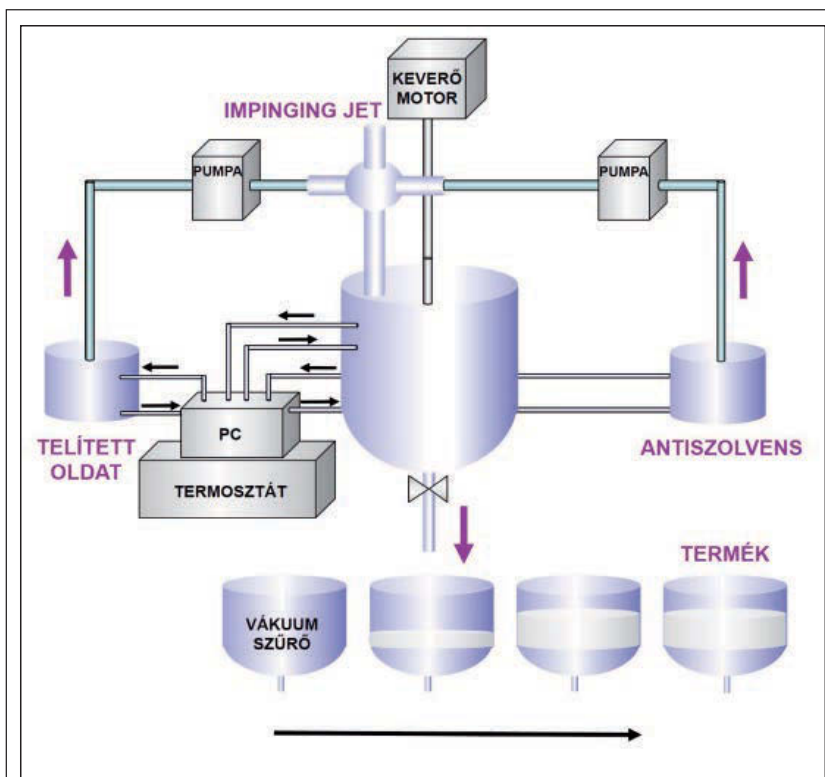
ciókat. A minták 40 °C-on, 24 óráig történő vákuum szárítása után zárt edényekben voltak tárolva. A teljes berendezés felépítése az **1. ábrán** látható.

### 2.3. Termékek analitikai vizsgálatai

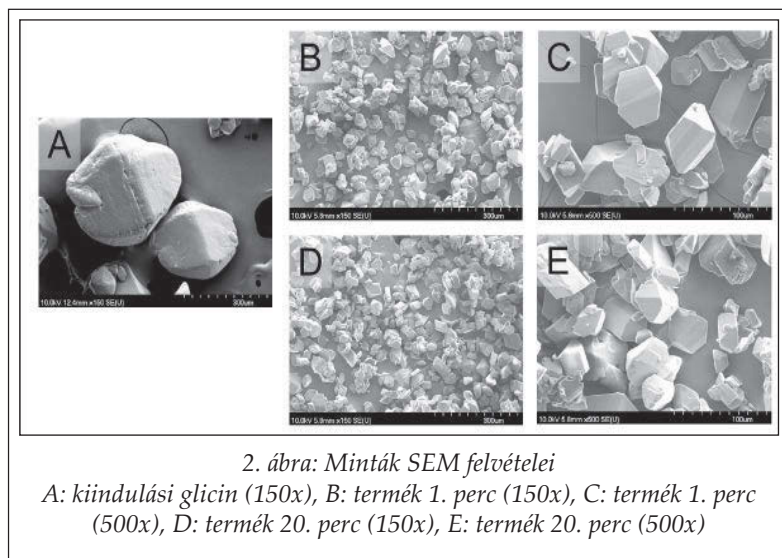
#### 2.3.1. Kristály habitus és szemcseméret-eloszlás vizsgálata

A kristályosított termékek kerekdedségének és szemcseméretének vizsgálatát LEICA fénymikroszkópos képanalizátor (Leica LEICA Q500MC, LEICA Cambridge Ltd., Cambridge, UK), valamint pásztázó elektronmikroszkóp (SEM, Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokyo, Japán) segítségével végeztük. A SEM minták felületét arany-palládium bevonattal láttuk el a megfelelő elektromos vezetőképesség biztosítása céljából, Bio-Rad SC 502 készülék (VG Microtech, Uckfield, UK) alkalmazásával.

A minták szemcseméret-eloszlását Malvern Mastersizer 2000 lézerdifrakciós szemcseméret analízáló berendezéssel (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) határoztuk meg, száraz módszerrel Scirocco száraz poradagoló segítségével. Két párhuzamos mérést alkalmaztunk minden minta esetében, a táblázatok az átlag értékeket tartalmazták.



1. ábra: A saját fejlesztésű impinging jet kristályosítási rendszer sematikus felépítése



### 2.3.2. Polimorfia vizsgálata

A termékek polimorfiját porröntgen (XRPD) készülék és differenciáló pásztázó kaloriméter (DSC) segítségével vizsgáltuk. Az XRPD mérésekhez Bruker D8 Advance diffraktométert (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) alkalmaztunk. A vizsgálatok fő paraméterei a következők voltak: szögteromány:  $3^{\circ}$ - $40^{\circ}$  2-Theta; lépésköz:  $0,01^{\circ}$ . A kristályosított termékek diffraktogramjait a Cambridge Szerkezeti Adatbázis adataival hasonlítottuk össze (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, Cambridge, UK).

A DSC analízis Mettler Toledo DSC 821<sup>e</sup> (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Svájc) berendezéssel történt. Az adatok értékelését STAR<sup>e</sup> ver. 9.30 software-rel végeztük. A vizsgálatok paraméterei: hőmérsékleti tartomány:  $25$ - $300^{\circ}\text{C}$ ; fűtési sebesség:  $10^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ .

### 2.3.3. Szennyezők vizsgálata

A minták maradék oldószer-tartalmának meghatározása headspace gázkromatográfiás módszerrel történt, vizsgálatainkat Varian CP-3800 gázkromatográf (Varian, Inc., Walnut Creek, CA, USA) végeztük, DB-624 kapilláris oszlopon ( $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 1,4\text{ }\mu\text{m}$ , nominal) kiegészítve Tekmar Dohrmann 7000 headspace automatikus mintavétővel és lángionizáló detektorral.

A kristályosítási additívként alkalmazott kálium maradék koncentrációjának pontos mérésére Perkin Elmer 4100 ZL (Überlingen, Németország) atomabszorpciós lángspektrométert alkalmaztunk (FAAS), deutérium háttér korrekciós rendszerrel és levegő-acetilén láng alkalmazásával.

## 3. Eredmények értékelése

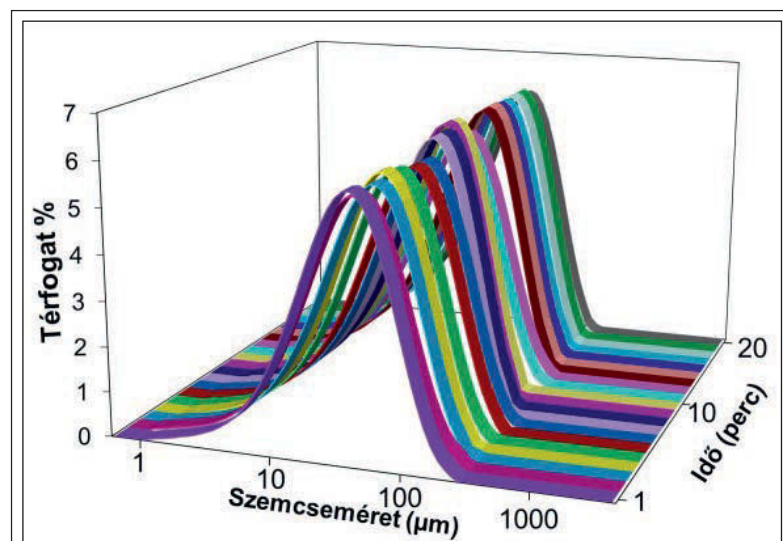
### 3.1. Kristály habitus és szemcseméret-eloszlás

Az impinging jet antiszolvens kristályosítás során megnövelt térfogattal ( $1000$ - $1000\text{ ml}$ ) végeztük el kísérleteinket, a kristályosító reaktorban utókeverés nélkül folyamatosan történt a szuszpenzió továbbhaladása a szűrőbe, ahol percnként történt a mintavétel. Egy kristályosítási kísérlet időtartama  $20$  perc volt, a megadott paraméterekkel  $3$  párhuzamos mérést végeztünk. A továbbiakban az eredmények átlagértékeit mutatjuk be.

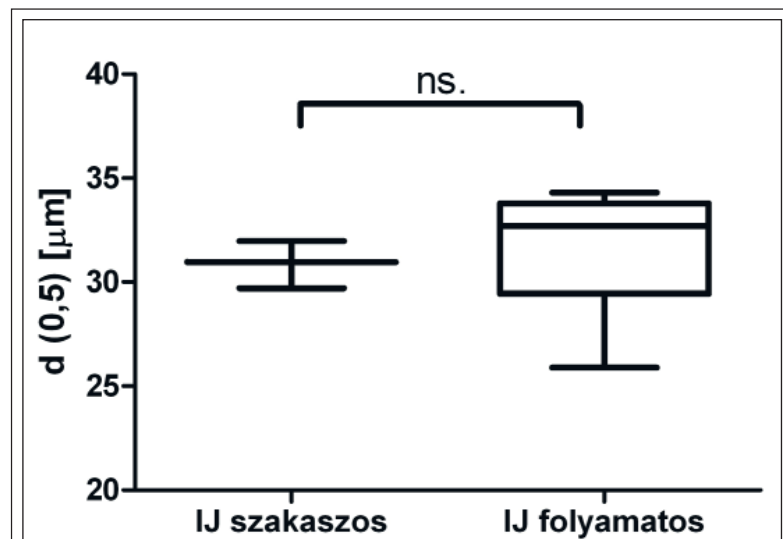
A SEM felvételeken látható, hogy a kiindulási anyag lekerekített oldalú, nagy, izodimenziós szemcsékből áll, ezzel szemben az impinging jet kristályosított termékek szemcsemérete jelentősen csökkent, alakja bipiramidális, felszíne sima. A gyors kristályosítási eljárásból adódóan az élek és csúcsok nincsenek lekerekedve. Ezek a tulajdonságok biztosítják, hogy a kristályok egyedi szemcsé-

I. táblázat  
Kristályosított minták szemcseméret-eloszlása

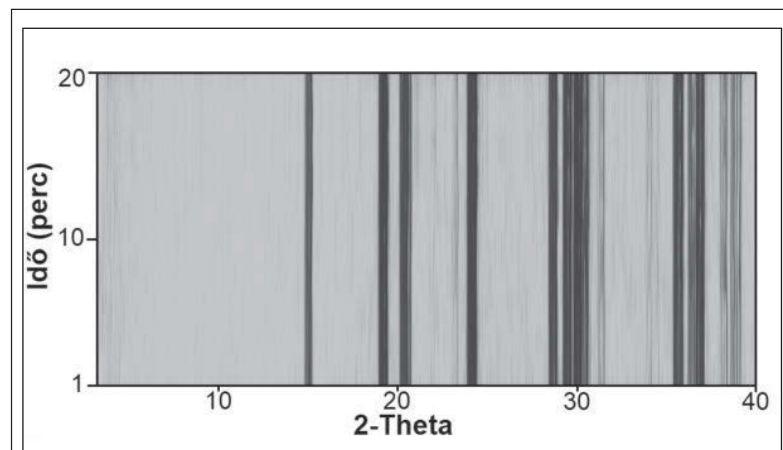
Minta [perc]	d (0,1) [ $\mu\text{m}$ ]	d (0,5) [ $\mu\text{m}$ ]	d (0,9) [ $\mu\text{m}$ ]
1.	8,524	27,934	70,382
2.	7,701	25,899	68,285
3.	8,520	29,278	74,356
4.	8,360	28,265	69,346
5.	8,758	29,969	75,320
6.	9,292	33,190	82,260
7.	9,577	34,313	84,812
8.	9,657	33,825	77,717
9.	9,674	34,066	78,151
10.	8,990	30,854	70,155
11.	8,864	30,308	69,338
12.	8,567	29,334	72,748
13.	8,626	29,748	74,385
14.	9,605	34,028	77,861
15.	9,627	33,880	77,352
16.	9,259	32,922	76,072
17.	9,197	32,470	75,244
18.	9,367	33,379	76,586
19.	9,417	33,622	77,036
20.	9,358	33,719	78,712
Átlag	9,047	31,550	75,306
Szórás	0,54	2,54	4,35
Relatív szórás	0,06	0,08	0,06



3. ábra: Impinging jet kristályosított termékek szemcseméret-eloszlása



4. ábra: Átlagos szemcseméret összehasonlítása a szakaszos kristályosítási eljárás termékeivel



5. ábra: A termékek kétdimenziós XRPD diffraktogramjai

ket alkotnak, aggregációra kevésbé hajlamosak. A 2. ábrán a kiindulási anyag és a folyamatos kristályosítás során az első és a huszadik percben vett minták SEM felvételei láthatóak, különböző nagyítással készítve. A képek alapján megfigyelhető, hogy nem történt jelentős változás a kristály morfológiában a kristályosítás teljes időtartama alatt.

A kristályosított minták mikrometriai adatait az I. táblázatban foglaltuk össze. Feltüntettük a 20-20 minta szemcseméret analízisére vonatkozó  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  és  $d(0,9)$  értékeket, átlagot, szórást és relatív szórást számoltunk. Az alacsony szórásértékek azt igazolják, hogy a kristályosítási folyamat során nem változnak jelentősen az említett paraméterek.

A szemcseméret-eloszlási görbék alapján kijelenthető, hogy a minta mindegyike monodiszperz eloszlást mutat, az állandó kristályosítási körülményeknek köszönhetően az eloszlás lefutása is azonos (3. ábra).

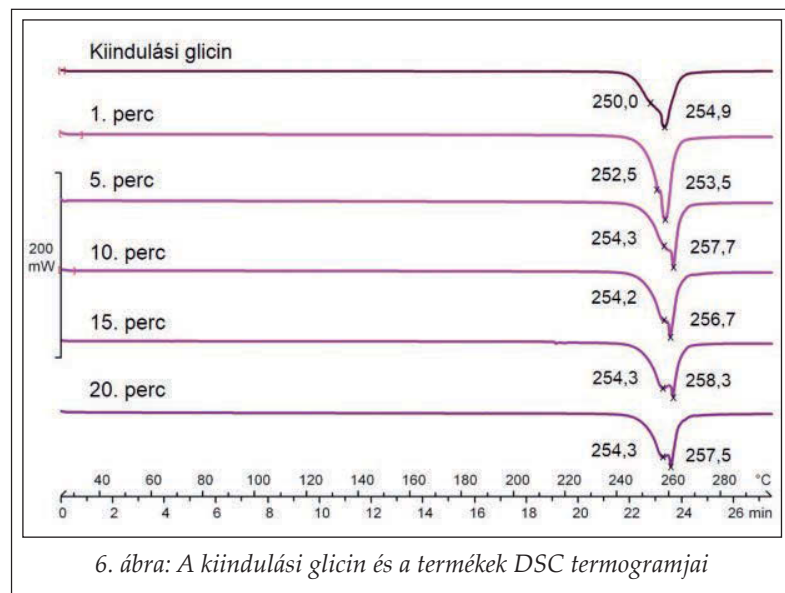
A korábbi szakaszos eljárás 52-62% kitermelési százalékot eredményezett, amelyhez képest növekedés volt tapasztalható, hiszen a folyamatos módszerrel 64-70%-ra emelkedett a kitermelés értéke. A keletkezett glicin szuszpenzió teljes mennyisége a szűrőfelületre jutott, így elkerülhető volt a műveletek közötti anyagvesztés. A folyamat során az impinging jet elem elzáródása, illetve egyéb működési nehézség nem volt megfigyelhető.

A szakaszos és folyamatos módszerrel előállított minták átlagos szemcseméret különbségét statisztikai szoftverrel, kétmintás t-próba segítségével hasonlítottuk össze (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), amely alapján megállapítottuk, hogy a szakaszos (29,707-31,967  $\mu\text{m}$ ) és a folyamatos (25,899-34,313  $\mu\text{m}$ ) módszer termékei között nincs szignifikáns különbség (4. ábra).

### 3.2. Polimorfia

A kiindulási anyag és a kristályosított termékek kristályszerkezetét XRPD





6. ábra: A kiindulási glicin és a termékek DSC termogramjai

berendezéssel vizsgáltuk, és az eredményeket a Cambridge Szerkezeti Adatbázis diffraktogramjaihoz hasonlítottuk. A mérések alapján mind a kiindulási glicin, mind a termékek kristályformája a leggyakrabban előforduló  $\alpha$ -polimorf volt. A kristályosítási folyamat során nem tapasztaltunk a polimorfiában eltérést. Eredményeinket az 5. ábrán szemléltetjük.

Korábbi vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a DSC termoanalitikai módszer érzékenyebb az instabil  $\beta$ -glicin jelenlétére [24]. Ennél az analitikai eljárásnál a  $\beta$ -formára jellemző, 251 °C-nál jelentkező csúcs már kis (5% alatti) mennyiségben is megjelenik, amely az  $\alpha$ -glicin 254 °C-os endoterm csúcsához kapcsolódva, kis vállként jelentkezik, ezért pontos mennyisége nem határozható meg. A porráöntgen vizsgálatok során ez a mennyiség még nem detektálható. Ezek alapján már a kiindulási glicin is tartalmazott kis mennyiségben  $\beta$ -polimorfot. A kristályosított termékekben ugyancsak megfigyelhető volt az  $\alpha$ - és  $\beta$ -forma keverékének megjelenése, a kristályosítás folyamatának előrehaladásával a  $\beta$ -glicin mennyisége kis mértékben növekedett. A növekedés oka feltehetőleg a kezdeti  $\beta$ -polimorf jelenléte, amely indukálta az instabil forma megjelenését (6. ábra).

### 3.3. Maradék oldószer- és maradék kálium-tartalom

A headspace gázkromatográfiás mérések alapján meghatároztuk a termékek maradék oldószer-tartalmát. A gyors kristályosítási folyamat következtében előfordulhat, hogy a kristálynövekedés során oldószer zárványok keletkeznek a szemcsékben, így fontos a pontos meghatározásuk. Az eta-

nol az ICH Q3C (R5) irányelv szerint a 3. csoportba tartozik, a maximális értéke 5000 ppm lehet [25]. A termékekben 38 ppm és 80 ppm közötti maradék etanol koncentráció volt mérhető, így ez megfelelt az előírt követelményeknek.

A habitus javítása céljából alkalmazott kálium mennyiségét a termékekben FAAS mérések alapján határoztuk meg. A maradék kálium koncentrációja 22-48 ppm közé esett a mintákban, amely nem jelent nagy mértékű szennyezettséget.

## 4. Összefoglalás

A fejlesztett impinging jet antiszolvens kristályosítási módszer glicin modell anyag esetében alkalmasnak bizonyult a folyamatos kristályosítás kivitelezésére. A módszer reprodukálható és pontos, valamint rövid idő alatt magas kitermeléssel, jó minőségű termék állítható elő. A korábbi, szakaszos kristályosítás során optimalizált paraméterek jól alkalmazhatóak a folyamatos technológia esetén is, hiszen a termékek fizikai-kémiai tulajdonságai nem térnek el szignifikánsan a szakaszos módszer mintáihoz képest. A kapott kristályok átlagos szemcsemérete (31,55  $\mu\text{m}$ ) szignifikánsan csökkent a kiindulási anyaghoz (680,69  $\mu\text{m}$ ) képest, megfelelő kerekdedség, stabil polimorf módosulat, alacsony maradék oldószer- és kristályosítási additív (kálium) tartalom mellett. Összegezve, a szakaszos kristályosítási módszerek folyamatos technológiává történő konvertálásával elérhető a magasabb kitermelési százalék, valamint az előállításához szükséges idő jelentős csökkentése, a termék fizikai-kémiai tulajdonságainak változása nélkül.

## Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak Ambrus Ritának a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek elkészítéséért, és Szakonyi Gerdának az atomabszorpciós lángspektrométer használatában nyújtott segítségért.

## IRODALOM

1. Acevedo, D., Peña, R., Yang, Y., Barton, A., Firth, P., K. Nagy, Z. K.: Chem. Eng. Process. 108, 212–219 (2016).
2. Plumb, K.: Chem. Eng. Res. Des. 83, 730–738 (2005).
3. Gerogiorgis, D. I., Barton, P. I.: Steady-state optimization of a continuous pharmaceutical process. 10th In-

- ternational Symposium on Process Systems Engineering (2005) 927–932
4. Quon, J. L., Zhang, H., Alvarez, A., Evans, J., Myerson, A. S., Trout, B. L.: *Cryst. Growth Des.* 12, 3036–3044 (2012).
  5. Lawton, E. S., Steele, G., Shering, P.: *Org. Process Res. Dev.* 13, 1357–1363 (2009).
  6. Liu, W., Ma, C. Y., Xue, Z., Wang: *Procedia Eng.* 102, 499–507 (2015).
  7. Liu, W., Ma, C. Y., Liu, J. J., Zhang, Y., Wang, X. Z.: *AIChE J.* 63, 967–974 (2017).
  8. Su, Q., Nagy, K. Z., Rielly, C. D.: *Chem. Eng. Process.* 89, 41–53 (2015).
  9. Farkas Béla, Révész Pirooska: *Kristályosítástól a tabletázásig*. Universitas Szeged Kiadó, Szeged, 2007. 13–17. old.
  10. Furuta, M., Mukai, K., Cork, D., Mae, K.: *Chem. Eng. Process.* 102, 210–218 (2016).
  11. Tamura, H., Kadota, K., Shirakawa, Y., Tozuka Y., Shimotsuka, A., Hidaka, J.: *Adv. Powder Technol.* 25, 847–852 (2014).
  12. Hassan, M. S., Lau, R.: *Int. J. Pharm.* 413, 93–102 (2011).
  13. Variankaval, N., Cote S. A., Doherty, M. F.: *AIChE J.* 54(7), 1682–1688 (2008).
  14. Tobler, D. J., Rodriguez Blanco, J.D., Dideriksen, Sand, K. K., Bovet, N., Benning, L. G., Stipp, S. L. S.: *Procedia Earth and Planetary Science* 10, 143–148 (2014).
  15. Yang, X., Lu, J., Wang, X.-J., Ching, C.-B.: *J. Cryst. Growth* 310, 604–611 (2008).
  16. Sekar, C., Parimaladevi, R.: *Spectrochimica Acta Part A* 74, 1160–1164 (2009).
  17. Midler, M., Paul, E. L., Whittington, E. F., Futran, M., Liu, P. D., Hsu, J., Pan, S. H.: *Patent US 5 314 506* (1994).
  18. Woo, X.Y., Tan, R. B.H., Braatz, R. D.: *Cryst. Growth Des.* 9, 156–164 (2009).
  19. Jiang, M., Li, Y.-E. D., Tung, H.-H., Braatz, R. D.: *Chem. Eng. Process.* 97, 242–247 (2015).
  20. Bakar, A. M. R., Nagy, Z. K., Saleemi, A. N., Rielly, C. D.: *Cryst. Growth Des.* 9(3), 1378–1384 (2009).
  21. Boldyreva, E. V.; Drebuschak, V. A.; Drebuschak, T. N.; Paukov, I. E.; Kovalevskaya, Y. A.; Shutova, E. S.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 73, 409–418 (2003).
  22. Weissbuch, I., Torbeev, Yu. V., Leiserowitz, L., Lahav, M.: *Angew. Chem.* 117, 3290–3293 (2005).
  23. Tari, T., Fekete, Z., Szabó-Révész, P., Aigner, Z.: *Int. J. Pharm.* 478, 96–102 (2015).
  24. Tari, T., Ambrus, R., Szakonyi, G., Madarász, D., Froberg, P., Csóka, I., Szabó-Révész, P., Ulrich, Joachim, Aigner, Z.: *Chem. Eng. Technol.* 40(7), 1–10 (2017).
  25. International Conference on Harmonisation: ICH guideline Q3C(R5) on impurities: Guideline for residual solvents, EMA/CHMP/ICH/82260/2006 Committee for Human Medicinal Products (2015).

Érkezett: 2017. június 19.





## A *Tanacetum parthenium* L. partenolid tartalmának szuperkritikus fluid extrakciója: kísérlettervezés, modellezés, optimalizálás

VÉGH KRISZTINA\*, RIETHMÜLLER ESZTER, ALBERTI ÁGNES, TÓTH ANITA,  
BÉNI SZABOLCS, KÉRY ÁGNES

Farmakognóziai Intézet, Semmelweis Egyetem Budapest, Üllői út 26. – 1085

\*Levelező szerző, e-mail: krisvegh@gmail.com

### Summary

VÉGH K., RIETHMÜLLER E., ALBERTI Á., TÓTH A., BÉNI SZ. KÉRY Á.: **Supercritical fluid extraction and convergence chromatographic determination of parthenolide in *Tanacetum parthenium* L.: experimental design, modeling and optimization**

Feverfew (*Tanacetum parthenium* L., Asteraceae) is a perennial medicinal plant which has been used to alleviate the symptoms of migraines, headaches and rheumatoid arthritis. The herb contains various potentially active constituents such as sesquiterpene- $\gamma$ -lactones, flavonoids and volatile oil. The main sesquiterpene-lactone in feverfew is parthenolide which is considered to be responsible for the therapeutical effects. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction was carried out at different pressures (10-30 MPa), temperatures (40-80 °C) and co-solvent contents (0-10% ethanol) in order to study the extraction yield and the parthenolide recovery of the extracts. Leaves collected before and during flowering and flower heads were investigated. A factorial experiment using a full 3<sup>3</sup> design was followed during the experiments and response surface methodology was implemented to analyze the influence of the variables and optimize the extraction. The critical values of parthenolide content were found to be 7% EtOH, 22 MPa and 64 °C in case of all three samples. It was determined, that the optimal conditions of the extraction, where the maximum parthenolide content and extract yield can be reached, do not coincide. The highest yield of parthenolide was obtained in the flower heads (0.604% wt.).

**Keywords:** *Tanacetum parthenium* L., Supercritical fluid extraction, Experimental design, Response surface methodology, Convergence chromatography

### Összefoglalás

Az Európában és Ázsiában honos őszi margitvirág évszázadok óta ismert gyógy- és dísznövény. Az 1970-es évek óta a migrén, fejfájás, reumatoid arthritis kezelésére alkalmazzák. Jelentősebb tartalom anyagai a szeszkviterpén-laktonok, illóolaj és flavonoidok. Jelenlegi ismereteink szerint a hatás szempontjából legfontosabb vegyülete a COX-2 és NF- $\kappa$ B gátló, prosztaglandin-, tromboxán- és leukotrién termelést csökkentő, az 5-HT vérlemezkekből való felszabadulását gátló partenolid, amellyel kapcsolatba hozzák a növény migrénellenes hatását.

Az őszi margitvirág partenolid tartalmának kinyerésére és az extraktumok hatóanyag tartalmának maximalizálására számos módszert dolgoztak ki. Napjainkban az olyan új, korszerű és környezetbarát módszerek, mint a szuperkritikus fluid extrakció előtérbe kerültek. Vizsgálataink során az őszi margitvirág (*Tanacetum parthenium* L.) mintákat szuperkritikus fluid széndioxiddal extraháltuk, melyhez egy 3 tényezős faktoros 3 szintes kísérleti tervet állítottunk össze, ahol a hőmérséklet 40, 60 és 80 fok, a nyomás 10, 20 és 30 MPa, az eluens polaritásának változtatására pedig 0, 5 és 10% etanolt alkalmaztunk. A mérési pontokra válaszfelületet illesztve vizsgáltuk a hőmérséklet, a nyomás és a módosító oldószer mennyiségének kölcsönhatását. A szuperkritikus fluid extrakcióval előállított minták vizsgálatával adatokat gyűjtöttünk a partenolid növényrészekben, illetve vegetációs periódus alatti feldúsulásáról és optimalizálni tudtuk a kivonási körülményeket a hatóanyagban gazdag extraktumok előállítására. A virágzás előtt és alatt gyűjtött levél, valamint a virágzat partenolid tartalmának optimum értékét 7%-os etanol tartalom mellett 22 MPa-on és 64 °C-on érték el. Megállapítottuk, hogy a szárazanyag-tartalom és a partenolid-tartalom optimum értéke nem esik egybe. Az extraktumok tartalmi anyagainak mérésére konvergens kromatográfiás (UPC<sup>2</sup>) módszert fejlesztettünk ki és validáltunk.

**Kulcsszavak:** *Tanacetum parthenium* L., Szuperkritikus fluid extrakció, Faktoros kísérleti terv, Válaszfelület-módszer, Konvergens kromatográfia

### Bevezetés

Az őszi margitvirág évszázadok óta ismert gyógy- és dísznövény. A tradicionális gyógyászatban hosszú ideje alkalmazzák, az 1970-es években

azonban szakirodalmi adatokkal is alátámasztották migrén profilaktikus, fejfájás- és gyulladás-csökkentő hatását [1-4]. Jelenlegi ismereteink szerint a *Tanacetum parthenium* L. kivonatok COX-2 és NF- $\kappa$ B gátló, prosztaglandin-, tromboxán- és

leukotrién termelést csökkentő, az 5-HT vérelemezkékből való felszabadulását gátló hatásait bizonyították [5-9]. Legjelentősebb tartalmi anyaga a szeszkviterpén-lakton családba tartozó partenolid, melynek a növény migrénellenes hatását tulajdonítják [1, 3, 4].

Az őszi margitvirág partenolid tartalmának ki-nyerésére és az extraktumok hatóanyag tartalmának maximalizálására számos módszert dolgoztak ki. Szerves és szervetlen oldószerrendszereket vizsgáltak ultrahangos és Soxhlet kivonással [10, 11]. A legmagasabb partenolid tartalmat a virágzatban (1,38%) találták, melyet a levél drogok követtek (0,95%). A szár és a gyökérzet partenolid tartalma elhanyagolható volt [12].

A szuperkritikus fluid extrakció, mint új, korszerű és környezetbarát módszer, számos előnnyel rendelkezik a hagyományos oldószeres extrakcióval szemben, mivel viszonylag alacsony hőmérsékleten megvalósítható, az értékes komponensek nem károsodnak a művelet során. A növény mintát nagynyomású szuperkritikus széndioxid (SC-CO<sub>2</sub>) extraháljuk, kihasználva annak jó oldóképességét és szelektivitását, majd a nyomás csökkentésével a szén-dioxidot elválasztjuk az extraktumtól, így a kapott kivonat akár teljesen oldószermentes lehet. A hőmérséklet, a nyomás és a hozzáadott módosító oldószer arányának változtatásával a kivonat összetétele befolyásolható [13-19]. Az őszi margitvirággal kapcsolatban számos szuperkritikus fluid extrakciós vizsgálatot közöltek. *Smith és Burford* [20] a növény föld feletti részét 250 baron, 40°C-on extrahálták, első lépésben tiszta széndioxid (0,8 m/m% partenolid), majd 4% acetonitril és metanol hozzáadásával növelték a kivonószert polaritását, amely megduplázta a kivonatok partenolid tartalmát. *Kaplan és munkatársai* [21] SC-CO<sub>2</sub>-ot alkalmaztak különböző nyomás értékeken (100-300 atm), 100°C-on, majd a kapott partenolid értékeket összehasonlították a hagyományos módszerrel történő kloroformos kivonás esetén elért eredményekkel. Megállapították, hogy a legmagasabb arányban a virágzat és ezen belül is a magok tartalmaznak partenolidot, és hogy a SFE sokkal hatékonyabb, mint a hagyományos oldószeres kivonási módszerek. *Kéry és munkatársai* [22] egy 3<sup>2</sup> teljes, faktoros kísérleti tervet állítottak össze a félüzemi alkalmazás optimalizálására. Vizsgálták a kivonat szárazanyag és partenolid tartalmát. Az alkalmazott nyomás értékek 100 és 400 bar között, a hőmérséklet 40 és 60 °C között változtak. A partenolid tartalom a 400 bar és 60 °C esetén mutatta a legmag-

sabb értéket (5,2 m/m%). *Cretnik és munkatársai* [23] laboratóriumi szakaszos működésű műszert alkalmaztak 200 és 300 bar nyomáson, 40, 60 és 80 °C-on. A két szeparátor alkalmazásával a partenolidot részben el tudták különíteni a kivont zsíros anyagoktól.

Napjainkban egyre népszerűbb a szub- és szuperkritikus fluidok kromatográfia területén való alkalmazása. A konvergens kromatográfia ötvözi az ultra nagynyomású folyadék- és a szuperkritikus fluid kromatográfia előnyeit, többek között csökken a vizsgálat ideje és az oldószerfogyasztás, illetve drasztikusan megnő a csúskapacitás és érzékenység. Az UPC<sup>2</sup> kromatográfia alkalmas poláris és apoláris, illékony illetve nem illékony komponensek elemzésére.

Munkánk célja olyan részletes kísérleti terv megalkotása volt, ahol vizsgálni tudjuk a változók (nyomás, hőmérséklet, polaritást módosító oldószer) lineáris, négyzetes és egymással való kölcsönhatását a kivonatok szárazanyag és partenolid tartalmára. A módosító oldószer etanol volt, annak nem toxikus, és környezetbarát tulajdonságai miatt. Az őszi margitvirág mintákat virágzás előtt és a teljes virágzás alatt gyűjtöttük, majd az utóbbiakat levélre és virágzatra bontottuk. Ezen három mintán végeztük modellkísérleteinket. Elsőként vizsgáltuk a hatóanyag feldúsulást a vegetációs periódus függvényében, a partenolid tartalom kvantitatív vizsgálatára nagy hatékonyságú konvergens kromatográfiai módszert fejlesztettünk ki és validáltunk.

## Anyagok és módszerek

### Növéyminta

A Vácrátóti Botanikus Kertből származó magmintákat szabadföldi körülmények között neveltük Érden, a mintákat virágzás előtt és a teljes virágzás alatt gyűjtöttük, majd levélre és virágzatra választottuk szét. Ezen három mintán végeztük modellkísérleteinket. A minták méretét darálás után 40-50 meshben állapítottuk meg.

### Oldószeres és reagensek

A szuperkritikus fluid extrakció és kromatográfia során alkalmazott széndioxid 99,5%-os tisztaságú volt és a Linde Kft.-től, a partenolid referencia vegyületet, az alkalmazott reagens minőségű módosító etanolt és a HPLC minőségű acetonitrilt a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be.

### Szuperkritikus fluid extrakció

A szuperkritikus fluid extrakcióra laboratóriumi készüléket alkalmaztunk, amely Peltier hűtőrendszerrel felszerelt Jasco PU-2080 CO<sub>2</sub> pumpából és a módosító oldószer hozzáadását biztosító Jasco MX-2080-32-es dinamikus keverőből állt. A CO-2060 plus intelligens extrakciós/kolonna termosztátban a kolonna pozícióba egy 1 ml-es extrakciós csövet helyeztünk, melyet megtöltöttünk az aprított drogokkal. Az állandó nyomást a Jasco BD-2080 nyomásszabályozó egység biztosította. Az extrakciót MD-2010 plus detektorral 205 nm-en kísértük figyelemmel, melyet egy nagy nyomású cellával szereltünk fel. A kivonásokat egy órán át végeztük, a kivonószár áramlási sebessége 0,4 ml/perc volt.

### Kísérleti terv

Vizsgálatainkra 3 mennyiségi faktoros 3 szintes (3<sup>3</sup>) kísérleti tervet állítottunk össze, melyben a hőmérséklet 40, 60 és 80 °C, a nyomás 10,20 és 30 MPa, az eluens polaritásának változtatására pedig 0%, 5% és 10% etanolt alkalmaztunk. Vizsgáltuk a változók lineáris, négyzetes és egymással való kölcsönhatását az extrakció során a kivonatok szárazanyag és partenolid tartalmára, a vegetációs peridiódusra és a szervrészekre való tekintettel.

Az oldószer áramlási sebességet (0,4 ml/perc) az extrakciók során állandó értéken tartottuk és a kivonási idő minden esetben 1 óra volt.

A kísérleti terv 27 extrakcióból és az eredmények reprodukálhatóságának vizsgálatára a terv centrumában elvégzett 3 mérésből állt. Két további kivonást végeztünk az optimum pontban a kísérlet hitelességének bizonyítására.

A három szignifikáns független változó közti matematikai kapcsolatot általános négyzetes polinomból fejeztük ki:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_P + \beta_2 X_T + \beta_3 X_{EtOH} + \beta_{11} X_P^2 + \beta_{22} X_T^2 + \beta_{33} X_{EtOH}^2 + \beta_{12} X_P X_T + \beta_{13} X_P X_{EtOH} + \beta_{23} X_T X_{EtOH}$$

ahol az Y a válasz,  $\beta_0$  egy konstans érték,  $\beta_1$  (EtOH),  $\beta_2$  (P) és  $\beta_3$  (T) a lineáris,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  és  $\beta_{33}$  a négyzetes és  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  és  $\beta_{23}$  a faktorok egymással való kölcsönhatását leíró koefficiensek. A statisztikai vizsgálatokhoz Statistica szoftvert alkalmaztunk. A regressziós modell illeszkedésének jószágát a determinációs koefficienssel, az R<sup>2</sup>-vel és ezek korrigált értékeivel bizonyítottuk. A szignifikáns faktorok és interakciók meghatározásához varianciaanalízist alkalmaztunk.

### Ultra nagyhatékonyságú konvergens kromatográfia (UPC<sup>2</sup>)

A szuperkritikus fluid kivonatok kromatográfiás vizsgálatát Waters ACQUITY Ultra-Performance Convergence Chromatography (UPC<sup>2</sup>) műszerrel végeztük (bináris pumpa, automata mintaadagoló, kolonna termosztát, dióda detektor, nyomásszabályozó). Az elválasztáshoz 45°C-ra termosztált Acquity UPC<sup>2</sup> BEH C18 oszlopot (100mmx3mm, 1,7 µm, Waters, MA, USA) alkalmaztunk. A komponensek elválasztását izokratikus programmal végeztük: 0-5 perc 18% B, 2 ml/perces áramlási sebességgel, ahol az eluensek szuperkritikus széndioxid (A) és acetonitril (B) voltak. A kromatogramokat 210 nm-en rögzítettük, az UV spektrumokat 200-400 nm közti tartományban vettük fel. A teljes rendszer nyomása 2000 psi volt. Az adatok feldolgozása Empower 3 szoftverrel történt.

A validáció során vizsgáltuk a módszer helyességét, linearitását, a retenció idő ismételhetőségét, az LOD és LOQ értékeket, a precizitást és napok közti ismételhetőséget. Az eredmények minden esetben megfeleltek az ICH biológiai mintákra vonatkozó irányelveinek. A partenolid standardot acetonitrilben feloldva kalibrációs sort készítettünk 0,0313-0,5000 mg/ml tartományban. Hat koncentráció értéket vizsgáltunk háromszor ismételve a méréseket, majd a mérési eredményekre kalibrációs egyenest illesztettünk, melyet lineáris regresszió analízissel vizsgáltunk. A kimutatási és meghatározási határt az alapvonalzaj háromszorosának illetve tízszeresének megfelelő magasságú jelet adó koncentrációként határoztuk meg. A validálás során vizsgáltuk a módszer helyességét, a kivonathoz ismert mennyiségű standard oldatot adva. A pontosságot 9 mérésből határoztuk meg (3 koncentráció/ 3 ismétlés). A napok közti ismételhetőséget három egymást követő napon határoztuk meg, három eltérő koncentráció mérésével. A standard oldatok hígítása minden esetben független tömegbeméréssel történt.

### Eredmények és diszkusszió

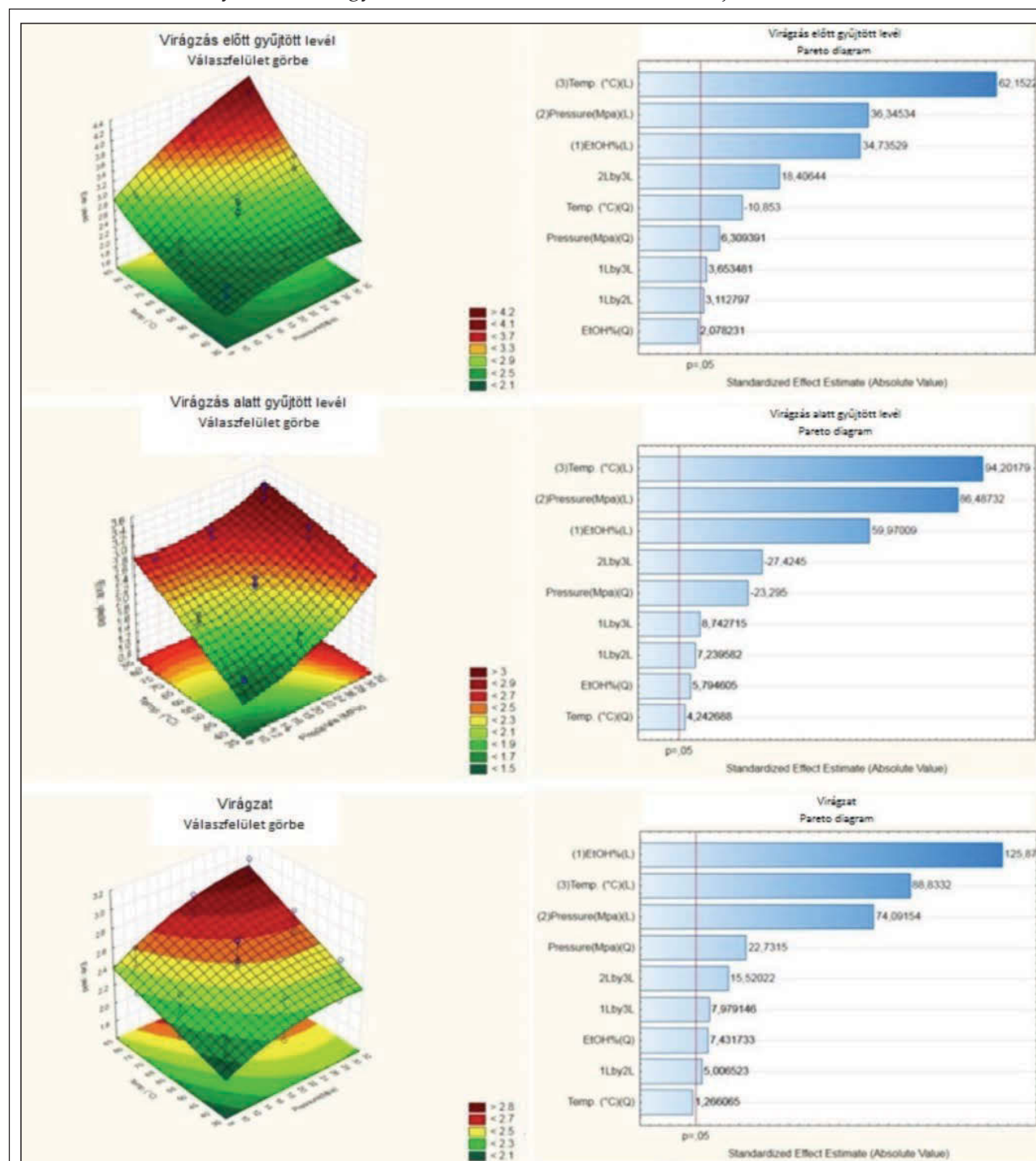
#### UPC<sup>2</sup> validálás

A linearitás vizsgálatok során a partenolid standard oldatok (0,0313; 0,0625; 0,1250; 0,2500; 0,5000 mg/ml) mérésével kapott csúcstartományokat az elméleti koncentrációk függvényében ábrázolva a pontokra egyenest illesztettünk. Az egyenes egyenleteként  $y = 271,08x + 0,917$  összefüggést kaptunk, ahol a tagok szignifikanciáját t-próbastatisztika



kával ellenőriztük. Az eredményekből kiderült, hogy a tengelymetszetnek nincs statisztikailag értékelhető hatása az összefüggésre. Az illetett függvény alkalmasságát F-próbastatisztikával ellenőriztük és bizonyítottuk, hogy az illetett

függvény adekvát. A koncentráció függvényében ábrázolt reziduumok eloszlása nem mutat egyirányú menetet, az értékek véletlenszerűen szóródtak. A retenciós idő ismételhetőségének relatív standard deviációja 0,075% volt.

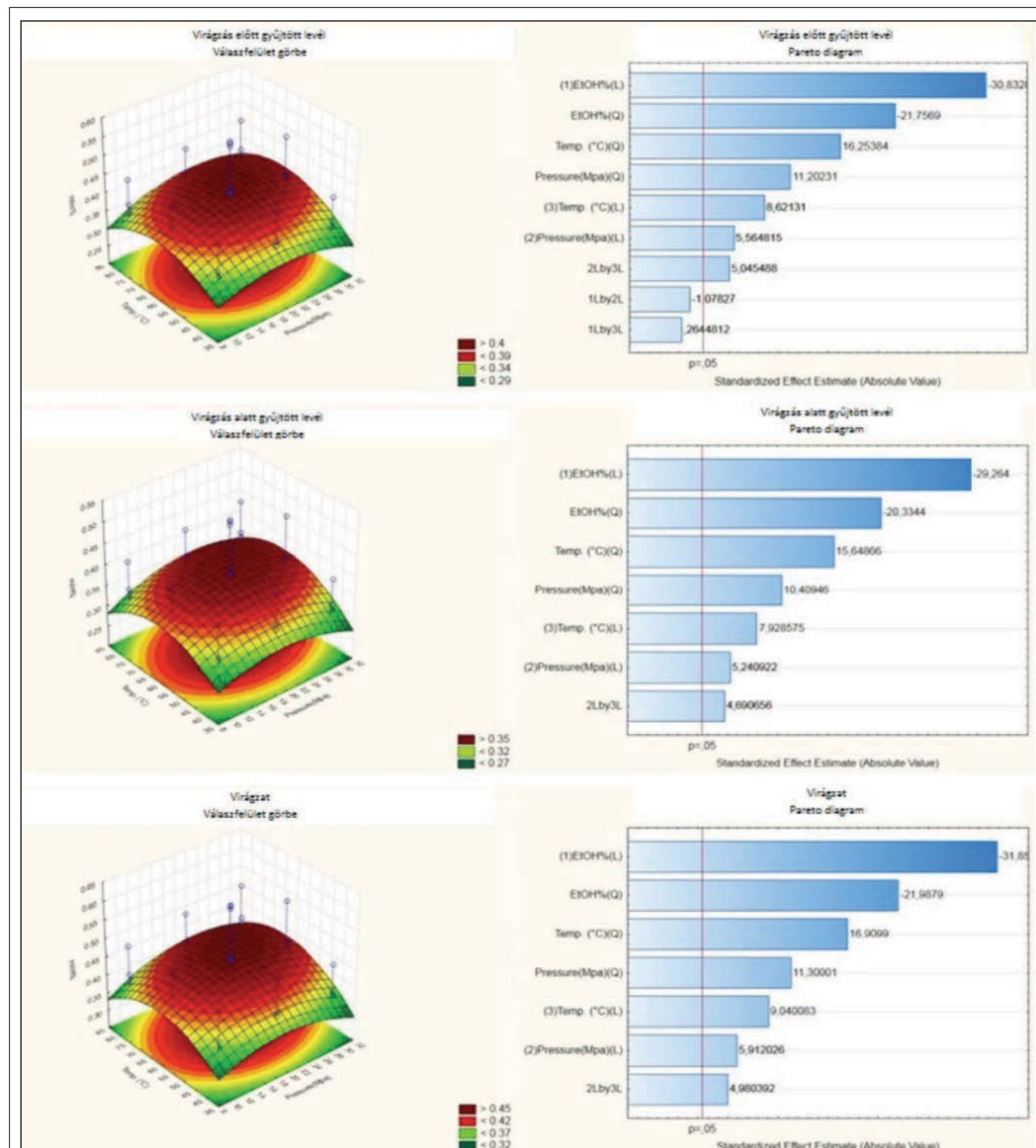


1. ábra. A *Tanacetum parthenium* L szuperkritikus fluid extraktumok szárazanyag tartalmának válaszfelület görbéi, az előre jelzett és a mért értékek diagramjai és a Pareto diagramok.

Jelmagyarázat: Exp. Yield-Szárazanyag tartalom, Temp.-Hőmérséklet, Pressure-Nyomás, Predicted values-Előrejelzett értékek, Observed values-Mért értékek, L-Lineáris kölcsönhatás, Q-Négyzetes kölcsönhatás, Standardized effect estimate-Változók abszolút hatása az extrakcióra

A kimutatási és meghatározási határt  $LOD = 3 \cdot S/N$  és  $LOQ = 10 \cdot S/N$ -ként határoztuk meg. Így a kimutathatóságot  $3,677 \mu\text{g/ml}$ , a meghatározhatóságot pedig  $11,142 \mu\text{g/ml}$  koncentrációban állapítottuk meg.

A helyesség meghatározásához a szuperkritikus *Tanacetum parthenium* L. kivonathoz ismert koncentrációjú standard oldatokat adtunk három hígításban. A visszanyerés 94,77% és 100,72% között adódott, a relatív standard deviáció pedig minden



2. ábra. A *Tanacetum parthenium* L szuperkritikus fluid extraktrumok partenolid tartalmának válszfelület görbéi, az előre jelzett és a mért értékek diagramjai és a Pareto diagramok.

Jelmagyarázat: Exp.-Yield-Szárazanyag tartalom, Temp.-Hőmérséklet, Pressure-Nyomás, Predicted values-Előrejelzett értékek, Observed values-Mért értékek, L-Lineáris kölcsönhatás, Q-Négyzetes kölcsönhatás, Standardized effect estimate-Változók abszolút hatása az extrakcióra

esetben kevesebb, mint 0,20% volt mindhárom esetben.

A pontosság vizsgálatok során három különböző koncentrációban elkészített standard oldatot vizsgáltunk három ismételt mérés során. A napok közti ismételtheséget három egymást követő napon három különböző koncentrációban elkészített standard oldattal vizsgáltuk három ismételt mérés során. Az RSD% értékek alapján megállapítottuk, hogy a módszer pontos és jól ismételhető.

#### *Szuperkritikus fluid extrakció*

Munkánk célja olyan szuperkritikus fluid extraktumok előállítása volt a *Tanacetum parthenium* L. mintákból, amelyekben maximalizálni tudjuk a kivonatok partenolid tartalmát. Egy  $3^3$  teljes faktoris kísérleti tervet állítottunk elő a virágzás előtt és alatt gyűjtött levelek és a virágzat tanulmányozására. Vizsgáltuk a kivonatok szárazanyag tartalmát is. Mindhárom minta esetében a legalacsonyabb szárazanyag tartalmat 10Mpa, 40 °C, 0% etanol hozzáadásával, a legmagasabbat 30Mpa, 80 °C, 10% etanol hozzáadása során kaptuk. A partenolid tartalom esetén a minimum értéket 30Mpa, 40 °C, 5% etanol tartalom mellett, a maximumot pedig 20Mpa, 60 °C, 0% etanol tartalom mellett tapasztaltuk. Polinomiális regresszióval válaszfelületet illesztettünk a kapott értékekre, hogy vizsgálni tudjuk a faktorok (nyomás, hőmérséklet, módosító oldószer) hatását az extrakcióra. A szárazanyag tartalom esetén a determinációs koefficiens 0,973 és 0,996 között mozgott, amely az illesztett válaszfelület jó illeszkedését mutatta. Az  $R^2$  a partenolid tartalom esetében alacsonyabb értékeket (0,931-0,934) vett fel. Az illeszkedés jóságának javítására a Student féle t-próbát elvégezve, eltolítottuk a 95%-os megbízhatósági intervallumon nem szignifikáns tagokat az egyenletből.

A virágzás előtt és alatt gyűjtött levél és virágzat kivonatok szárazanyag tartalmának válaszfelület görbéit 5%-os etanol tartalmú szuperkritikus fluid extrakció esetén a **1. ábra** mutatja be. A determinációs együttható értéke növekedett (0,972, 0,996, 0,993), a redukált egyenletet alapul véve. Az illesztett modell jóságát megerősítette az előre jelzett és a mért értékek diagramja, melyen a pontok az egyenes mentén jó korrelációval helyezkedtek el.

A hatások Pareto diagramja mutatja az egyes változók abszolút hatását az extrakcióra. A virágzás előtt és alatt gyűjtött levelek esetében a hőmérséklet jelentősebben befolyásolja a kivonást, mint

a nyomás. A nyomás és a hőmérséklet is jelentős pozitív hatást gyakorol az extrakcióra, ugyanígy a nyomás kvadratikusan hatása és a nyomás és hőmérséklet interakció. A nyomás növekedésének pozitív hatása magyarázható a komponensek jobb oldódásával állandó hőmérsékleten, míg magas nyomáson a komponensek kioldódása csökken a hőmérséklet csökkenésével. Ez a kereszt effektus általában 20 és 35 Mpa értékek esetén lép fel és a csökkenő oldószer sűrűség és gáz nyomás hatására fordul elő. Kevésbé hatásosak a hőmérséklet-etanol, az etanol és az etanol-nyomás kvadratikusan hatások. Az oldószer etanol tartalma szintén jelentősen befolyásolja a kivonatok szárazanyag tartalmát. A módosító oldószer mennyisége megváltoztatja a szuperkritikus oldószer polaritását, így az értékes és a kevésbé értékes komponensek kioldódását is növeli. A virágzatból kivont szárazanyag mennyiségre a legszignifikánsabb hatást a kivonó fluid etanol tartalma gyakorolja, emellett a hőmérséklet és a nyomás emelkedése és ezek egymásra hatása is pozitívan befolyásolja a kivonást [22].

A minták szárazanyagtartalmának vizsgálata folyamán megállapítottuk, hogy a vizsgált hőmérséklet, nyomás és módosító mennyiségek esetén nem érjük el a kitermelési maximumot.

#### *Partenolid tartalom*

A virágzás előtt és alatt gyűjtött levél és virágzat kivonatok partenolid tartalmának válaszfelület görbéit 5%-os etanol tartalmú szuperkritikus fluid extrakciónál a **2. ábra** mutatja be. Az  $R^2$  értékei itt is alacsonyabbak voltak (0,931, 0,930, 0,934), mint a szárazanyag tartalom vizsgálatoknál, azonban az illesztett modell jóságát megerősítette az előre jelzett és a mért értékek diagramja, melyen a pontok az egyenes mentén jó korrelációval helyezkedtek el.

A Pareto diagrammok mutatják, hogy a legnagyobb abszolút hatással a szuperkritikus fluid széndioxid etanol tartalma bír, negatívan befolyásolva az extrakciót. A módosító oldószer mennyisége megnöveli a szuperkritikus oldószer polaritását, így elősegítheti a polárosabb szeszkviterpénlaktonok és flavonoidok kioldódását, azonban a kevésbé értékes komponensek is extrahálódnak. A hőmérséklet és nyomás hasonlóképpen a szárazanyag tartalomhoz itt is pozitívan befolyásol, mind lineáris, mind négyzetes formában. Megfigyelhető a partenolid tartalom növekedése 60 °C-ig, majd csökkenése 80 °C-on. A csökkenés kiváltó oka lehet az anyag oldhatóságának csökkenése illetve annak hőérzékenysége. Mivel a kromatográfiás vizsgálá-



tok során nem találtunk bomlásra utaló komponenseket, így az utóbbi lehetőséget kizártuk.

A virágzat mintáknál találtuk a legmagasabb partenolid tartalmat (0,604%), amely összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal [12, 23]. Megállapítottuk, hogy a levelek partenolid tartalma a vegetációs periódus előre haladtával csökken.

Az optimum pont mindhárom minta esetén azonos, a legmagasabb partenolid tartalmat 7% etanol hozzáadásával, 22 Mpa-on, 64 °C-on értük el. Kontrolmérésekkel ellenőriztük a modell által számolt optimum pont helyességét. Ezek eredménye a virágzás előtt gyűjtött levél mintáknál 0,399%, a virágzás alatt gyűjtötteknél 0,375% és a virágzatnál 0,453%-os partenolid tartalom volt. Az előre jelzett értékek (0,406%, 0,381%, 0,447%) nem tértek el szignifikánsan a mért értékektől, így megállapítható az illesztett válaszfelület helyessége.

### Összefoglalás

Munkánk célja olyan optimális szuperkritikus fluíd extrakciós körülmények kialakítása volt őszi margitvirág kivonatok előállítására, ahol a kivonatok szárazanyag és partenolid tartalmát maximalizálni tudjuk. Az extraktumok partenolid tartalmának mérésére megbízható, gyors és pontos konvergens kromatográfias módszert fejlesztettünk ki és validáltunk. Bizonyítottuk az UPC<sup>2</sup> módszer előnyeit, így a nagy felbontást, az érzékenységet, a jó reprodukálhatóságot és rövid analízis időt. Vizsgálataink során egy 3 mennyiségi faktoros 3 szintes kísérleti tervet állítottunk össze, melyben a hőmérséklet 40, 60 és 80 °C, a nyomás 10, 20 és 30Mpa volt, az eluens polaritásának változtatására pedig 0%, 5% és 10% etanolt alkalmaztunk. Vizsgáltuk a partenolid tartalom feldúsulását a vegetációs periódus és a szervrészek függvényében. A szárazanyag-tartalom és a partenolid-tartalom optimum értéke nem esik egybe: a szárazanyag tartalom maximum pontját 30Mpa-on, 80 °C-on 10%-os etanol tartalomnál, a partenolid tartalom maximális értékét 7%-os etanol tartalom mellett 22MPa-on és 64 °C-on értük el. A legmagasabb partenolid tartalmat a virágzatban mértük (0,604%). A virágzás előtt gyűjtött levelek száraz-

anyag és partenolid tartalma is magasabb volt a virágzás alatt gyűjtött levelekénél, tehát azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vegetációs periódus előre haladtával szignifikáns mennyiségi csökkenés következik be a levelek tartalmi anyagaiban.

### IRODALOM

1. Johnson, E. S., Kadam, N. P., Hylands, D. M., Hylands, P. J.: *Br Med J* 291, 569–573 (1985).
2. Murphy, J. J., Heptinstall, S., Mitchell, J. R.: *The Lancet* 2, 189–192 (1988).
3. Pittler, M. H., Ernst, E.: *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2286 (2004).
4. Pavela, R., Sajfrtová, M., Sovová, H., Bárnét, M., Karban, J.: *Industrial Crops and Products* 31, 449–454 (2010).
5. Jain, N. K., Kulkarni, S.K.: *J Ethnopharmacol* 68, 251–259 (1999).
6. Kwok, B. H., Koh, B., Ndubuisi, M. I., Eloffsson, M., Crews, C. M.: *Chem Biol* 8, 759–766 (2001).
7. Collier, H. O., Butt, N. M., McDonald, W. J., Saeed, S.A.: *The Lancet* 2, 922–923 (1980).
8. Makheja, A. N., Bailey, J. M.: *Prostaglandins, Leukotrienes, and Medicine* 8, 653–660 (1982).
9. Pugh, W. J., Sambo, K.: *J Pharm Pharmacol* 40, 743–745 (1988).
10. Zhou, J. Z., Kou, X., Stevenson, D.: *J Agr Food Chem* 47, 1018–1022 (1999).
11. Rey, J. P., Levesque, J., Poussot, J. L.: *J Chromatogr A* 605, 124–128 (1992).
12. Heptinstall, S., Awang, D. V. C., Dawson, B. A., Kindack, D., Knight, D. W., May, J.: *J Pharm Pharmacol* 44, 391–395 (1992).
13. Castro-Vargas, H. I., Rodríguez-Varela, L. I., Ferreira, S. R. S., Parada-Alfonso, F.: *J Supercrit Fluid* 51, 319–324 (2010).
14. Yang, C., Xu, Y. R., Yao, W. X.: *J Agr Food Chem* 50, 846–849 (2002).
15. Braga, M. E. M., Ehlert, P. A. D., Ming, L. C., Meireles, M. A. A.: *J Supercrit Fluid* 34, 149–156 (2005).
16. Donelian, A., Carlson, L. H. C., Lopes, T. J., Machado, R. A. F.: *J Supercrit Fluid* 48, 15–20 (2009).
17. Ghoreishi, S. M., Heidari, E.: *J Supercrit Fluid* 72, 36–45 (2012).
18. Huang, K. J., Wu, J. J., Chiu, Y. H., Lai, C. Y., Chang, C. M. J.: *J Agr Food Chem* 55, 9014–9020 (2007).
19. Simándi, B., Kristo, Sz. T., Kéry, Á., Selmeczi, L. K., Kmezc, I., Kemény, S.: *J Supercrit Fluid* 23, 135–142 (2002).
20. Smith, R. M., Burford, M. D.: *J Chromatogr A* 627, 255–261 (1992).
21. Kaplan, M., Simmonds, M. R., Davidson, G.: *Turk J Chem* 26, 473–480 (2002).
22. Kery, A., Ronyai, E., Simandi, B., Lemberkovics, E., Deak, A., Kemeny, S.: *Chromatographia* 49, 503–508 (1999).
23. Cretnik, L., Skerget, M., Knez, Z.: *Sep Purif Technol* 41, 13–20 (2005).

## Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

### Közlésre elfogadunk:

1. Összefoglaló közleményeket, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.
2. Közleményeket, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.
3. Rövid közleményeket, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.
4. Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Felelősen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

### A kézirat elkészítésének módja:

#### a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal el látva készítjük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

### A hivatkozások módja:

#### Folyóiratcikk:

Teljes URL cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma, az alábbiak szerint:

1. Revell, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: J. Pharm. Sci. 86, 631-634 (1997)

#### Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rác I., Plachy J., Csontos A.: A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei. Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

#### Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): Chiral Separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31-68.

#### Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

### Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmaceutical Sciences. Eur. J. Pharm. Sci. 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. [http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&object\\_ID=6000268](http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&object_ID=6000268) [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábíán P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdey-Grúz T. és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; F. Csányi P., Fábíán P. és Hónyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szervetlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadók.

### b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A dolgozat címe (esetleg alcíme).

A szerző(k) teljes neve (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztővel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) munkahelye teljes postai címmel, valamint a levelező szerző e-mail címe.

### A dolgozat magyar nyelvű összefoglalása.

Strukturált (Bevezetés, Célkitűzés és Módszerek, Eredmények, Következtetések) A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

**Kulcsszavak:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat címe angol nyelven, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

### Angol nyelvű összefoglalás.

Strukturált (Introduction, Purpose and Methods, Results, Conclusions)

**Bevezetés,** amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

**Key-words:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

**Kísérleti rész,** amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

### Eredmények.

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

### Az eredmények értékelése.

### Ábracímek.

**Következtetések.** Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges köszönetnyilvánítások.

**Irodalomjegyzék.**





